

# ACTA

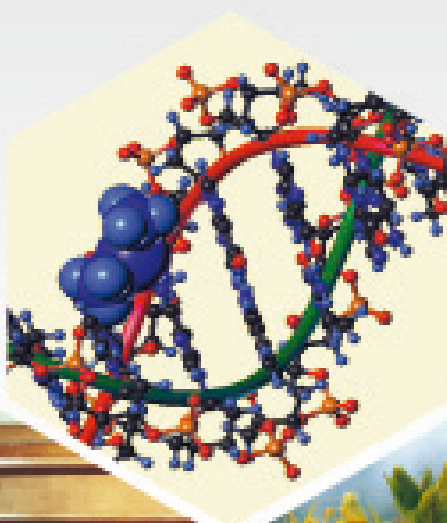
## PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata

# 1.

## 2011

APHGAO 81, (043) 1–48. (2011)





# ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság folyóirata

*Főszerkesztő:*

Noszál Béla, Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet  
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 9.  
Tel.: 217-0891;  
E-mail: nosbel@hogyes.sote.hu

*Felelős szerkesztő:*

Zelkó Romána, Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár,  
Gyógyszerügyi Szervezési Intézet,  
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 7–9.  
Tel.: 217-0927;  
E-mail: zelrom@hogyes.sote.hu

*A szerkesztőbizottság tagjai:*

Báthori Mária, Erős István, Gunda Tamás, Perjési Pál,  
Tóthfalusi László

*A szerkesztőség címe – Correspondence:*

Acta Pharmaceutica Hungarica  
1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 9.

*A főszerkesztő munkatársa:*

Hankó Zoltán MGYT,  
1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.  
Tel.: 235-0999; fax: 235-0998

---

## TARTALOM

<i>Noszál Béla, Szász György: Szabó László professzor úr köszöntése . . . . .</i>	03
<i>Balogh György Tibor, Könczöl Árpád: Növényi extraktumok az eredeti gyógyszerkutatásban: tradicionális érvek, új lehetőségek . . . . .</i>	05
<i>Baka Edit: Az egyensúlyi oldhatóság meghatározásának helyes gyakorlata . . . . .</i>	18
<i>Szunyogh Tímea, Ambrus Rita, Szabóné Révész Piroska: Szemcseméret csökkentés jelentősége a preformulációban . . . . .</i>	29
<i>Mártha Csaba, Jójártné Laczkovich Orsolya, Szabóné Révész Piroska: Amorf forma a gyógyszer technológiai kutatásokban . . . . .</i>	37
<i>Láng Péter, Szűts Angéla, Ambrus Rita, Szabóné Révész Piroska: Szacharóz-laurát olvadéktechnológiai alkalmazhatósága . . . . .</i>	43

## CONTENTS

<i>Noszál, B., Szász, Gy.:</i> László Szabó professor is 80 years old – greeting . . . . .	03
<i>Balogh, G.T., Könczöl, Á.:</i> Plant extracts in drug discovery: traditional considerations, novel chances . .	05
<i>Baka, E.:</i> Good laboratory practice of equilibrium solubility measurement . . . . .	18
<i>Szunyogh, T., Ambrus, R., Szabó-Révész, P.:</i> Importance of particle size decreasing in the preformulation	29
<i>Mártha, Cs., Jójárt-Laczkovich, O., Szabó-Révész, P.:</i> Amorphous form in pharmaceutical technological research . . . . .	370
<i>Láng, P., Szűts, A., Ambrus, R., Szabó-Révész, P.:</i> The applicability of sucrose laurate in hot-melt technology . . . . .	43

Acta Pharmaceutica Hungarica: [www.mgyt.hu](http://www.mgyt.hu)

„Acta Pharmaceutica Hungarica” a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata  
Kiadja a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16. Telefon: 235-09-99; E-mail: [szerkesztoseg@mgyt.hu](mailto:szerkesztoseg@mgyt.hu)  
**Felelős kiadó: Prof. Dr. Vincze Zoltán**

Előfizethető: Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16., belföldi postautalványon vagy átutalással  
az MGYT átutalási számlájára: OTP VIII. kerületi fiók, Budapest, József krt. 33.

MGYT elszámolási számla sz. 11708001–20530530

Adószám: 19000754–2–42

Előfizetési díj egész évre: 5133 Ft + 257 Ft áfa

Megjelenik negyedévenként. Példányszám: 930 db

Tördelőszerkesztő: *Oláh Csaba*

Sokszorosítás: Arrabonaprint & Partners Zrt. (Felelős vezető: Ványik László)

**Index: 25 101**

## Szabó László professzor úr köszöntése

Dr. Szabó László professor emeritus 1931. április 15-én született Szentgottárdon, pedagógus családban, ikergyermekként. Szülővárosában járt elemi- és középiskolába, ott is érettségizett 1949-ben. Ugyanez évben felvételt nyert a Pázmány Péter Tudományegyetem gyógyszerész szakára, ahol igen nagy túljelentkezés után kialakult kis létszámú évfolyamban (60 fő), kiváló hallgatókból álló igényes közösség [évfolyamtársai pl. Horváth Klára (Böjthe Gáborné), Burger Kálmán, Molnár Ibolya (Perl Miklósné)] egyik kiemelkedő hallgatója lett. Itt kielégíthette széles természettudományos érdeklődését, egyszersmind nagyszerű oktatóktól hallgathatta kedvenc tárgyát, a kémiát. Kémiai szemléletre elsősorban Endrői Pálnál, az elhivatott tanárnál az analitika kapcsán tett szert. Szerves kémiát Pongor Gábertől, majd speciál kollégium ill. ön- és továbbképzés keretében olyan világklasszis magyar tudósoktól tanult, mint Bruckner Győző, Zemplén Géza és Fodor Gábor. Diplomáját kitüntetéssel, már a jogutód Budapesti Orvostudományi Egyetem gyógyszerész szakán szerezte meg 1954-ben. Egyetemi gyakor nok 1953 és 1956 között volt, majd – az egyetemi ranglétrát végigjárva – előbb megbízott vezetője (1977-1980), később tanszékvezető egyetemi tanárként igazgatója (1980-1996) volt a Gyógyszerésztudományi Kar Szerves Vegytani Intézetének. Az 1957-ben alapított intézet az egyetemi tanulmányok befejezése utáni első, mindmáig egyetlen, egyszersmind jelenlegi munkahelye is, amelyben az önálló intézet megalakulása utáni szervezés, a „hőskor” embert próbáló feladataiból Szabó László az alapító Clauder Ottó professzor első munkatársaként vette ki részét. Mi több, történelmi érdekesség, hogy korábban került az intézet állományába, mint a tulajdonképpeni alapító professzor, Clauder Ottó.

Szabó professzor úr 2001-ben elnyerte a professor emeritus címet. Jelenleg ebben a minőségben dolgozik és tölti az „anya-intézetben” szolgálati idejének 58. évét. Igen nagy szerepe van abban, hogy a szerves kémia oktatása a budapesti Gyógy-



szerésztudományi Karon az Intézet megalakulása után kevéssel, a tartalmat és színvonalat tekintve is, meghatározó jelentőségű alapozó tárgyhoz méltó keretek között működhetett. Szabó professzor úr részese volt olyan, máig ható fejlesztéseknek a gyógyszerészek szerves kémiai oktatásában, melyek nyomán a tananyag fokozottabban vehette figyelembe a ráépülő alkalmazott tantárgyak tematikájának igényeit és harmonizált a gyógyszerészképzés további szak-  
tárgyaival. Az oktatás fejlesztésében, a jegyzetek elkészítésében való részvétel mellett az indulástól két évtizeden át laboratóriumi gyakorlatot vezetett, majd újabb húsz évig a „Szerves kémia” fő-kollégium előadója volt. „Gyógyszerszintézis”, „Elméleti szerves kémia”, „Természetes vegyületek kémiája” címmel speciál-kollégiumokat tartott. Az utóbbi két kötelezően választható tárgynak jelenleg is előadója. Saját magától, munkatársaitól és a hallgatóktól egyaránt sokat követelt, és mindezeket puritán szigorúsággal betartotta és betartatta.

Tudományos érdeklődésének középpontjában a természetes vegyületek kémiája, kiváltképp az alkaloidok (elsősorban indolalkaloidok), iridoidok (elsősorban a szekologanin), a heterociklusos kémia (főként a kinazolin-származékok szintézise és tulajdonságai) áll. A szilárd fázisú peptidszintézis mintájára megvalósította hazánkban a szilárd fázisú alkaloid-szintézist. Elmélyedt a szerves vegyületek szerkezet-meghatározásának módszereiben, így elsősorban az NMR spektroszkópiában. Részletesen tanulmányozta a szekologanin kémiáját és felépítette a szekologanin vegyületek családfáját. 1966-ban a sztrichnin néhány kémiai átalakítása témakörben készített disszertációjával egyetemi doktori címet szerzett. Alkaloidkémia polimer hordozón témájú munkái eredményeként 1977-ben lett a kémiai tudomány kandidátusa. 1991-ben habilitált doktorrá nyilvánították.

Bár mindenben a logikára, a rendre, az egyszerűsége törekszik, pozíciókra sohasem vágyott és afféle „antikarrierista” személyiség, számos tudományos szervezetnek lett vezetője vagy tagja, és

nem kerültek el a szakmai elismerések sem. Tagja a Magyar Tudományos Akadémia Alkaloidkémiai Munkabizottságának és Elméleti Szerves Kémiai Munkabizottságának, 15 éven át volt elnöke a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Külső Kutatási Szerződéseket Véleményező Bizottságának, elnöke volt a Magyar Gyógyszerészeti Társaság Gyógyszerkutató Szakosztályának, tagja volt a Gyógyszerészet és az Acta Pharmaceutica Hungarica c. folyóiratok Szerkesztő Bizottságának. A Semmelweis Egyetem Gyógyszerésztudományi Karán évről-évre megrendezett, arany-, gyémánt-, rubin-, vas és platina diploma átadási ünnepségen gyakran képviseli az egyetem vezetését a jubileumi ülés ünnepi szónokaként, magvas gondolatokkal téve mindenki számára emlékeztetést a rendezvényt.

1977-ben Kiváló Gyógyszerész, 1983-ban a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Kiváló Oktatója kitüntetés, 2004-ben Winkler Lajos Emlékér-

met kapott. 2011-ben, a Semmelweis Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar Tanácsának felterjesztése alapján, a március 15-i Nemzeti Ünnepek egyik legrangosabb rendezvényén *Réthy Miklós* nemzeti erőforrás minisztertől megkapta a Magyar Köztársasági Érdemrend Lovagkeresztje kitüntetését.

Amikor e sorok szerzői őszinte elismerésüket kifejezve köszöntik a 80 éves Szabó László professzor urat, gratulálnak önmagukért beszélő eredményeihez, köszönik a magyar gyógyszerészet, a kémiai tudományok és a budapesti gyógyszerészképzés szolgálatában kifejtett közel hat évtizedes munkáját, kívánják, hogy mindezen tevékenységeket mindnyájunk javára sok-sok további éven át, a maihoz hasonló kiváló egészségben folytassa!

Dr. Szász György  
Dr. Noszál Béla

## Növényi extraktumok az eredeti gyógyszerkutatásban: tradicionális érvek, új lehetőségek

\*BALOGH GYÖRGY TIBOR, KÖNCZÖL ÁRPÁD

Richter Gedeon Nyrt., Szintézistámogató Laboratórium, Budapest, Gyömrői út 30-32. – 1475

\*Levelező szerző, e-mail: gy.balogh@richter.hu

### Summary

Balogh, G.T., Könczöl, Á.: *Plant extracts in drug discovery: traditional considerations, novel chances*

Natural product based drug discovery, especially for strategies, based on plant extracts has several and almost traditional arguments. In practice, however, keeping in mind the interest of cost, the chemical diversity and the biological potential provided by secondary plant metabolites could be reached only by rational and harmonized adoption and application of related disciplines and technologies. New and relevant approaches and solutions are presented in this review regarding the accessible way, starting with the collection and extraction of plant material, via the robust high throughput biological screening (HTS) of extracts, reaching isolation, structure elucidation and development phase of the active principle. Special emphasis was made on applications, achieving HTS-compatible extracts and on on-line analytical technics, speeding up the complete isolation process. In addition, beside reviewing international trends and case studies, the results of the examination of the plant extract library of Gedeon Richter Plc. are published as well.

**Keywords:** plant extracts, original drug discovery, HTS, coupled analytical technics, active component isolation and identification.

### Összefoglalás

A természetes anyagokra, azon belül is a növényi extraktumokra épülő gyógyszerkutatási stratégia mellett számos, már-már tradicionálisnak mondható érve sorakoztatható fel. A költséghatékonyságot szem előtt tartó gyakorlatban azonban, a növényi anyagcseretermékek által elérhető kémiai diverzitás és biológiai hatáspotenciál realizálása és kiaknázása több tudományterület és technológia racionális és összehangolt alkalmazását követeli meg. Jelen közleményben a növényi alapanyag gyűjtésével és extrahálásával kezdődő, az extraktumok nagy áteresztőképességű biológiai szűrőkön (HTS) történő megbízható vizsgálatán át vezető, a hatóanyag izolálásáig, szerkezetazonosításáig és végül gyógyszerfejlesztésbe kerüléséig bejárható út legfontosabb, új megközelítéseit és megoldásait mutatjuk be. Az extraktumok HTS-kompatibilitásának elérését célzó alkalmazásokra és a teljes izolálási folyamat felgyorsítására képes, kapcsolt analitikai technikákra külön hangsúlyt fektetünk. A nemzetközi trendek és példák mellett a Richter Gedeon Nyrt. extraktum-könyvtárán végzett vizsgálatok tapasztalatai is összefoglalásra kerülnek.

**Kulcsszavak:** növényi extraktum, eredeti gyógyszerkutatás, HTS, kapcsolt analitikai technikák, aktív komponens izolálás és azonosítás.

### 1. Bevezetés

Az elmúlt két évtizedben a gyógyszerkutatásnak mind a gyógyszerkémiai, mind a farmakológiai megközelítése jelentős változáson ment át. Különösen igaz ez a korai fázisú kutatási stratégiára. A gyógyszerkémiaiában a parallel szintézis és a hozzáköthető elválasztástechnikák [szilárd fázisú extrakció (SPE), parallel flash kromatográfia] megjelenése, míg a farmakológiában a molekuláris biológia fejlődése és a nagy áteresztőképességű (*High Throughput Screening*, HTS) technikák megjelenése jelölte ki a változás irányát. E fordulatok hatására a gyógyszerkutatás kémiai kiindulópontjai is jelentősen megváltoztak. Míg a 90-es évek előtt a

gyógyszerjelöltek főként természetes (állati, növényi) eredetre vezethetőek vissza, addig az elmúlt húsz évben a HTS szűrés térnyerése következtében előtérbe kerültek, az elsősorban parallel szintézissel előállított, több százazres vagy akár milliós random vegyületkönyvtárak [1-3]. A randomizált könyvtárak viszonylagos sikere ellenére a 2000-es évek elejéig a természetes, és ezen belül is főként a növényi eredetű hatóanyagok gyógyszerkutatásban való alkalmazása megmaradt, illetve, mint a parallel szintézis kiinduló pontjai tovább gazdagították a kémiai teret. Ennek fő oka, hogy a random könyvtárakkal szemben a természetes eredetű vegyületek molekuláris szerkezetüket tekintve sokkal diverzebbek, illetve általában biológiai



hatásuk is kiterjedtebb [4, 5]. A növényi eredetű vegyületek ezen előnyös sajátságai mellett jelentős hátrányt jelentenek a növényi anyag gyűjtéséből, az aktív komponens izolálásából és a legtöbbször bonyolult kémiai szerkezetet hordozó hatóanyagból következő nehézségek.

A növényi anyag gyűjtése több szempontból is körülményes lehet. Egyrészt a gyűjtés csak idényszerűen végezhető, ami az egyes biológiai célpontokra csak időszakosan rendelkezésre álló HTS szűréssel időben nehezen összeegyeztethető. Másrészt a növények kémiai összetétele erősen függ a gyűjtés helyétől, módjától és idejétől [6, 7], így a kutatásnak már ebben a fázisában elengedhetetlen a megfelelő botanikai és fitokémiai háttérismeret. A biológiailag aktív növényi anyagból az aktív komponens izolálásának is jelentős idő-, illetve az izoláláshoz szükséges specifikus eszközök és tudás miatt extraköltség-vonzata van. Az izolálást sok esetben az is nehezíti, hogy az aktív vegyület a növényi kivonatban több rokonszerkezetű és így nagyon hasonló fizikai, fizikai-kémiai sajátságot hordozó másodlagos metabolit mellett, és csak igen kis mennyiségben van jelen. A szerkezetazonosításnál a nehézség a szerkezet bonyolultságából és sok esetben a növényi komponensek összetett sztereokémiájából fakad. A komplex kémiai szerkezet a gyógyszerkutatás és -fejlesztés további lépéseiben is problémát jelenthet. A növényi eredetű vegyületeket általában összetett, több lépéses, sok esetben sztereoszelektív szintézissel, egyes esetekben fermentációval lehet csak előállítani, ami a későbbi szerkezetoptimalizálás, illetve a kutatás későbbi, klinikai fázisához szükséges méretnövelt szintézis során is nehézséget jelenthet [8]. Mindezen feltételek nagyban nehezítik egy olyan természetes, elsősorban növényi eredetű extraktum-könyvtár létrehozását, ami az izolálás és szerkezetazonosításból fakadó háttér munkát is beleszámítva harmonizálható a gyorsuló biológiai szűrési eljárásokkal (HTS, ultraHTS), illetve megfelel a gyógyszeripari kutatási projektek ütemezésének [8]. Feltehetően ezen okokra vezethető vissza, hogy a 2000-es évek elejére több nagy gyógyszergyár (pl. Abbot Pharmaceuticals, Pfizer) is a természetes forrásból izolált hatóanyag azonosítási stratégia visszaszorítása, illetve leállítása mellett döntött [9]. Hasonló stratégiai döntés született a Richter Gedeon Nyrt-nél is. A Richter 1999-2001 között a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Farmakognózia és Szerves Vegytani Intézetével, a Szegedi Egyetem Farmakognózia Intézetével, valamint az MTA Ökológiai és Botanikai Kutatóinté-

zetével (Vácrátót) együttműködésben létrehozott egy a Kárpát-medencében honos, illetve természetű növényekből izolált közel 2000 db extraktumot magába foglaló könyvtárat. Azonban a Richterben ebben az időszakban lezajlott kutatási reform következtében, ami a nyugati gyógyszerkutatási trendnek megfelelően a HTS alapú hatóanyag szűrési megközelítés felé irányult, előtérbe helyeződött a kombinatorikus kémiai könyvtár alkalmazása és elvetésre került a növényi extraktum alapú kutatás folytatása.

Az elmúlt tíz évben elsősorban az elválasztástechnológiában és a szerkezetazonosítási eljárásokban történt jelentős változások több nemzetközi kutatóműhelyt, így a Richter kutatását is, a növényi eredetű gyógyszerkutatás újragondolására, a jelenkori kutatási stratégia megfelelő racionalizálására sarkalta. Ennek hátterében elsősorban a kombinatorikus kémiával előállított vegyületekből létrehozott molekulakönyvtárak nem megfelelő mértékű szerkezeti diverzitása és az ezekből származó HTS találatok elégtelen fizikai-kémiai sajátságaira visszavezethető (gyenge vízoldhatóság, fokozott lipofilitás) kedvezőtlen farmakokinetikai sajátságai állnak, amik jelentős mértékben nehezítik a találat (*hit*) – vezérmolekula (*lead*) irányú szerkezetoptimalizálási folyamatot. A témakörben több összefoglaló tanulmány is született. Jelen publikáció a nemzetközi irodalomban megjelent új megfontolásokat, valamint a Richterben eddig megvalósított, illetve tervezett stratégiát mutatja be a növényi extraktumokból kiinduló gyógyszerkutatásban.

## 2. Növényi drogok gyűjtése

A növényi eredetű kivonatok HTS alapú biológiai szűrőkön történő vizsgálatához szükség van egy jól tervezett, nagyszámú mintát tartalmazó bank létrehozására. Az extraktum bank minőségét, illetve a biológiai rendszerekben való hatását nagyban befolyásolhatja a kiválasztott növényfajok jellege. A kiválasztás történhet egy földrajzilag behatárolt területre jellemző flóra növényeinek random gyűjtésével, amikor az elsődleges szempont a biodiverzitás maximalizálása. Ily módon egy kémiai értelemben szerteágazó bioszintézissel rendelkező és kemotaxonómiailag is megfelelő növényi gyűjtemény hozható létre. A szelektálás történhet etnofarmakológiai alapon is. Ebben az esetben az ismert biológiai (gyógy-, illetve toxikus) hatással rendelkező növények drogjainak kiválasztásával nagyobb valószínűséggel lesznek jelen



a mintákban farmakológiai hatással rendelkező komponensek [10, 11]. A feltétel ez esetben is a kémiai új vegyület azonosítása, így az olyan gyógynövények kiválasztása az előnyös, melyeknek minél kisebb a fitokémiai feldolgozottsága, illetve az adott hatásért felelős komponense még nem ismert. Az első esetben a minél nagyobb és diverzebb kémiai tér lefedése, míg a második esetben a minták minél nagyobb számú biológiai aktív komponens tartalma a cél. A növényi kivonat részletes vizsgálatához és a hatásért felelős komponensének azonosításához, gazdaságos izolálásához szükség lehet nagyobb mennyiségű növényi anyag biztosítására. Ennek érdekében a kiválasztott növényekkel szemben támasztott általános elvárás, hogy az adott éghajlaton könnyen termesztethetők legyenek. A növényi anyag gyűjtésénél figyelembe kell venni, hogy a növények másodlagos metabolit tartalma és összetétele az egyes vegetációs időszakokban eltérő [12]. Ennek megfelelően nagyon fontos minden egyes növény esetében a gyűjtési időszak helyes megválasztása.

A Richter Gedeon Nyrt. 1999-2001 között, a bevezetésben bemutatott farmakognózia intézetekkel együttműködésben a fent meghatározott random kiválasztást követve közel 200 db a Kárpát-medencében honos, illetve termesztethető növényfajból megközelítőleg 300 db drogot gyűjtött össze eredeti gyógyszerkutatói céljaira. Az extraktum-könyvtár főbb paramétereit és a kiválasztott növényfajok összetételét az *I.* és a *II. táblázatban* mutatjuk be. A kialakított könyvtár mind rendszertani, mind gyógyászati felhasználtság (a könyvtárat alkotó drogok kevesebb, mint fele bír csak gyógyászatilag releváns irodalommal [13-16]) mintázata a nagyfokú diverzitást célzó random jellegűt mutatja. Az ajakosvirágzatúak (*Lamiaceae*) és a fészkesvirágzatúak (*Asteraceae*) családjaik domináns reprezentáltsága a Kárpát-medence flórájának egyfajta „leképezésére” is visszavezethető.

I. táblázat

A Richter extraktum-könyvtár legfontosabb paramétereit

Extraktumok száma	1564
Extraktum/drog	8
Családok száma	49
Fajok száma	130
Drogok száma	197
Gyógynövények aránya*	44,7%

\*=gyógynövényként értékelt a [13-16] forrásokban való előfordulás alapján.

II. táblázat

A Richter extraktum-könyvtár rendszertani összetétele

Család	Egyedszám
Lamiaceae	36
Asteraceae	25
Apocynaceae	4
Cupressaceae	4
Rosaceae	4
Apiaceae	3
Plantaginaceae	3
Urticaceae	3
Anacardiaceae	2
Fabaceae	2
Hypericaceae	2
Juglandaceae	2
Malvaceae	2
Nyctaginaceae	2
Rubiaceae	2
Acanthaceae	1
Acoraceae	1
Adoxaceae	1
Amaranthaceae	1
Araceae	1
Aristolochiaceae	1
Balsaminaceae	1
Betulaceae	1
Boraginaceae	1
Cannabaceae	1
Caryophyllaceae	1
Celastraceae	1
Cephalotaxaceae	1
Dryopteridaceae	1
Equisetaceae	1
Ericaceae	1
Euphorbiaceae	1
Ginkgoaceae	1
Lythraceae	1
Magnoliaceae	1
Moraceae	1
Myrsinaceae	1
Nymphaeaceae	1
Onagraceae	1
Papaveraceae	1
Ruscaceae	1
Rutaceae	1
Scrophulariaceae	1
Solanaceae	1
Strophariaceae	1
Tricholomataceae	1
Ulmaraceae	1
Verbenaceae	1
Vitaceae	1

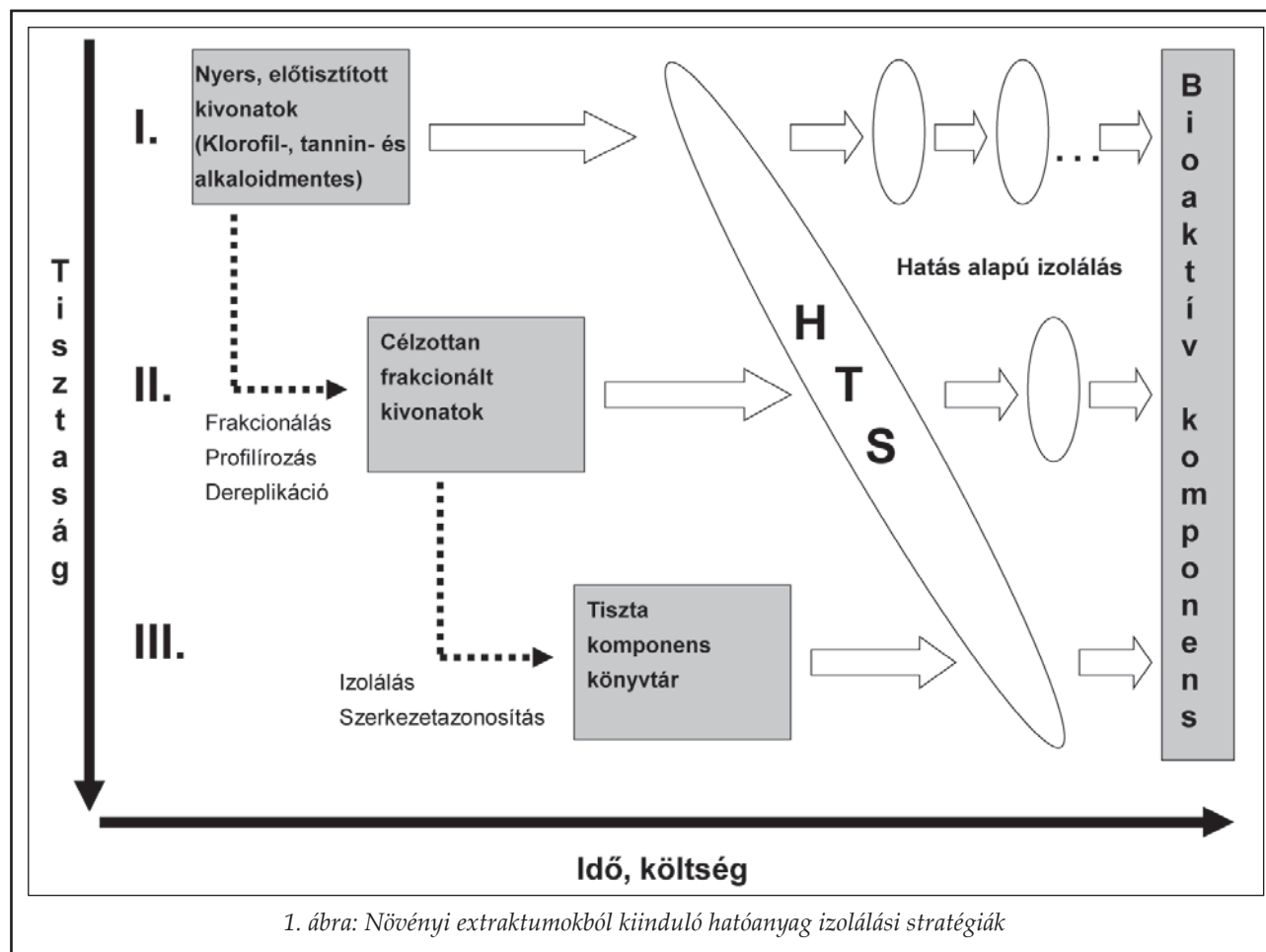
### 3. Növényi kivonatok elkészítése, előkészítése HTS vizsgálatokhoz

Növényi drogokból kiinduló extraktum-, illetve molekulabankhoz szükséges kivonatok elkészítése a minta komponenseinek számát, illetve az idő- és költségvonzatot figyelembe véve alapvetően három stratégiai utat követve valósulhat meg (**1. ábra**). Mind a három esetben a szárított növényi drogból (mag – *semen*; gyökér – *radix*; hagyma – *bulbus*; hajtásrendszer – *herba*; levél – *folium*; virágzat – *anthodium*; virág – *flos*; termés – *fructus*; rügy – *gemma*; kéreg – *cortex* stb.) a különböző tisztasági szintű kivonatok elkészítését egy szerves oldószeres (általában kloroformos) kivonatosítást követő tisztítási lépés előzi meg. Az előtisztítás során a kloroformos kivonatot poliamid gyanta segítségével elválasztják a biológiai teszteket nagymértékben zavaró klorofiltól, pigmentektől, fluoreszcens anyagoktól, illetve denaturáló ágensektől (pl. tanin származékoktól) [17, 18]. Ezen felül kationcserélő gyanta segítségével a jellemzően bázikus nitrogén tartalmú, specifikus biológiai hatással rendelkező alkaloidokat is külön lehet vá-

lasztani a kivonattól. Az így kapott kloroformos extraktumok a növényi drogból kinyerhető *apoláros* jellegű komponenseket tartalmazzák. A kloroformos extrakció szilárd maradékának, szűrletének metanolban történő kivonatosításával a növényi drog *poláros* komponensei is kinyerhetőek.

#### 3.1. I. stratégia: előtisztított, nyers extraktumok

Az I. típusú megközelítésben az ily módon izolált *poláros*, illetve *apoláros* előtisztított nyers extraktumok kerülnek biológiai HTS vizsgálatra. A nyers extraktumokkal történő HTS szűrés előnye, hogy a növényi drogyűjtéstől függően egy nagy biológiai és kémiai diverzitású kivonatbankot lehet viszonylag gyorsan létrehozni és egyúttal elkerülhető a *minor* alkotók elvesztése. Továbbá e stratégia közelíti meg legjobban, mind a kivonatok összetételét, mind minőségét tekintve az adott növényi drog népi gyógyászatban (etnofarmakológiai ismereten) alapuló felhasználását. Hátránya, hogy a sokkomponensű minták esetében a biológiai szűrők vizsgálatai sokszor szolgáltatnak álpozitív, álnegatív eredményeket és a komponensek között



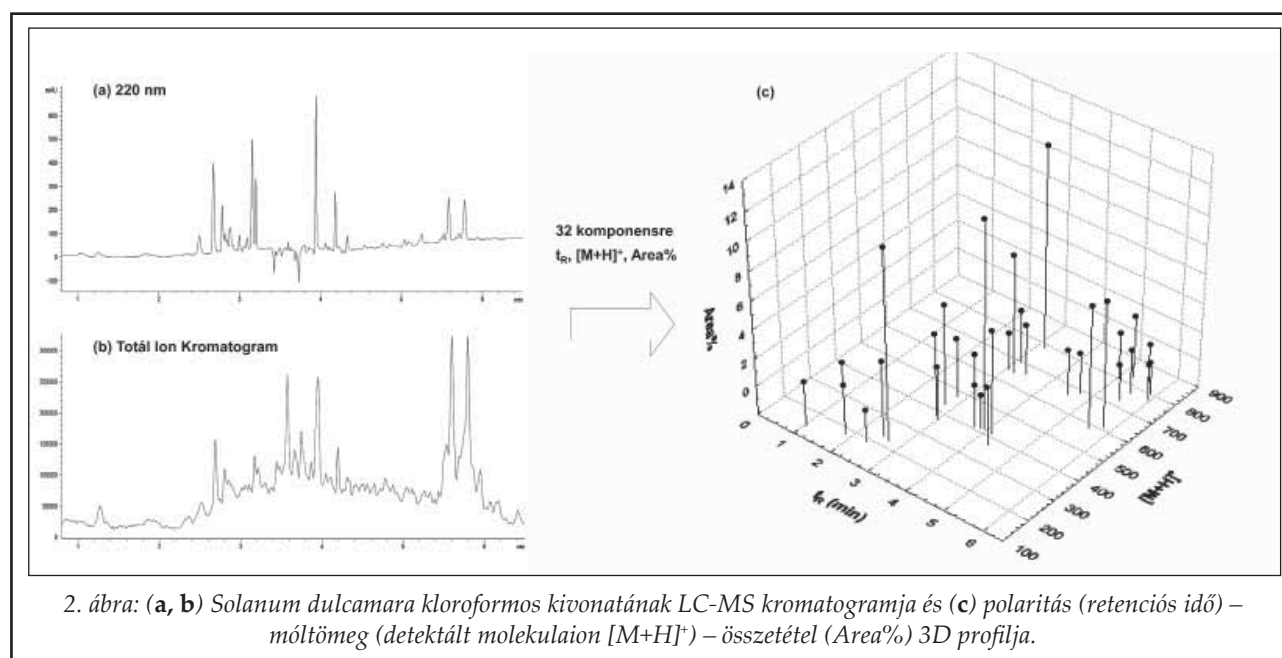
fellépő együttthatás/ellenhatás maszkírozott vagy nehezen értelmezhető biológiai válaszjelet eredményez [19]. Álpozitivitás megjelenésére jellegzetes példa a fokozottan hidrofób, illetve vízben rosszul oldódó (aggregátumot képző) vegyületek jelenléte, amelyek nem-specifikus módon kapcsolódnak a receptorokhoz. Álnegativitásra jellemző példa a *minor* komponensek jelenléte, vagyis azoknak a találatoknak az elvesztése, amelyek biológiai hatása az alacsony mintakoncentrációjuk miatt nem fejeződik ki [20, 21]. A nyers extraktumok esetében ki kell még emelni a replikáció veszélyét is, vagyis olyan növényi másodlagos metabolitok jelenlétét, amelyek jól ismertek és általánosan, nagy mennyiségben vannak jelen a növényekben (ubikviter vegyületek). Ezek sok esetben rontják az esélyt az új kémiai szerkezetű, vagy ismert, de adott hatásterületen még nem bizonyított hatású vegyületek azonosításának. Jó példa erre a GABA (de meg lehetne említeni itt több aminosavat), ami nagy mennyiségben fordul elő számos növényfajban és jelentős mértékben zavarhatja a GABAerg vizsgálatok esetén, mind a GABA inhibitorok, mind a GABA mimetikumok hatását [22].

### 3.2. II. stratégia: előfrakcionált extraktumok

A II. típusú megközelítés során az előtisztított nyers izolátumokból racionalizált megfontolások alapján maximálisan 5-10 db komponenst tartalmazó előfrakcionált kivonatokat alakítanak ki. Az előfrakcionálás történhet egyszerűen egy vagy több, megfelelő felbontóképességgel bíró elválasz-

tástechnikai lépés [pl.: preparatív gravitációs/nyomás alatti oszlop kromatográfia, ellenáramú folyadék-folyadék kromatográfia (CCC) illetve preparatív HPLC] vagy ezek optimális szekvenciájának alkalmazásával. Így, az eredeti, esetenként 50-100 db komponenst tartalmazó kivonathból, 5-10 db, LC-UV alapján alapvonalon elválasztható, komponenst tartalmazó kivonatokat hoznak létre (1. ábra). E stratégia esetén már kifejezett hangsúly kerül a dereplikáció megvalósítására, azaz az előzőekben tárgyalt nem kívánatos komponensek (pl.: a biológiai tesztrendszerben interferenciát okozó és/vagy ubikviter vegyületek) felismerésére és kiszűrésére [23]. A komponensek hatékony karakterizálására/beazonosítására használható spektroszkópiai módszereket (UV [24], MS [25], NMR [26]) kiválóan kiegészítik az egyre gazdagabbá váló, specifikus háttéradatbázisok. Ezek közül kiemelkedik a közel 770 000 db, természetes anyaghoz köthető, egyedi farmakológiai adatot magába foglaló NAPRALERT (<http://www.napralert.org>) és a 2010-ben már 230 000 db természetes vegyületet rendszerező Dictionary of Natural Products (<http://dnp.chemnetbase.com>).

A nyers kivonatokból történő frakcionálás és szelektálás történhet továbbá a gyógyszeryszerűsége leíró szabályok (Lipinski „rule of five” [27]; vezérmolekulákra vonatkozó, Oprea nevéhez fűződő „rule of 3” [28, 29]; illetve a vér-agy gát penetrációra vonatkozóan Pardridge [30], Clark [31] és Lobell [32] által leírt törvényszerűségek) szem előtt tartásával, illetve az egyes komponensek előre jelezhető farmakokinetikai sajátágaiból kiindulva is. A



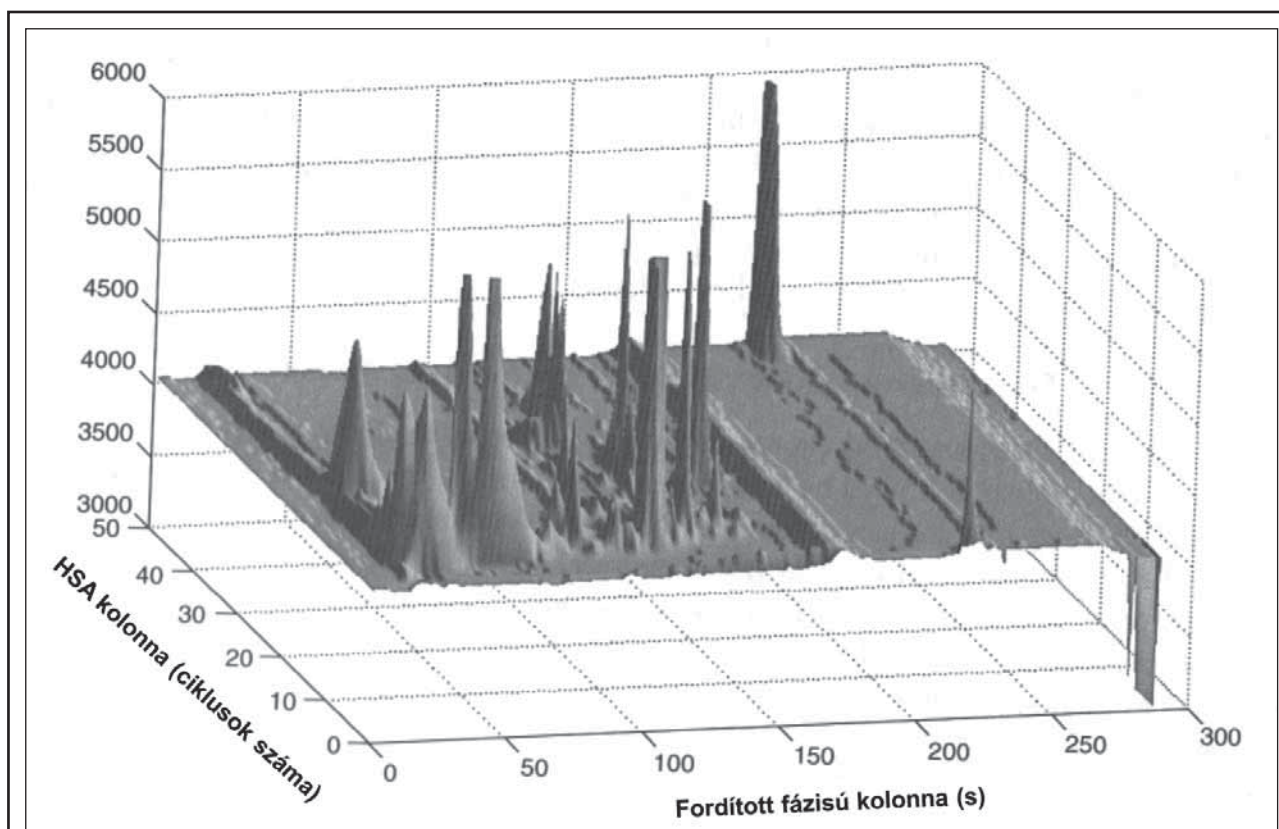
fenti szabályok alkalmazhatóságának alapvetően két korlátja van:

- figyelembe kell venni a növényi eredetű vegyületek és a szintetikus molekulakönyvtárak közt fennálló szerkezeti különbségeket (átlagos molekulatömeg 414 Da vs. 393 Da; gyűrűk száma 4,1 vs. 3,2; jellemzően kevesebb nitrogén, halogén és kén atom, másfelől viszont jelentősen több oxigén atom van jelen a növényi eredetű vegyületekben [33]),
- fontos, hogy idő- és költséghatékonyan a több komponensű növényi mintákban csak a hatóanyagok molekulatömege és lipofilitása határozható meg.

E kritériumoknak a gyakorlatban, első megközelítésben kromatográfiás technikákkal tudunk eleget tenni: az egyes komponensek lipofilitása fordított fázisú (RP) kromatográfiával mérhető és számolható a retenciós faktor ( $\log k'$ ) segítségével [34], míg a membrántranszportra vonatkozó sajátságuk immobilizált liposzóma-membrán (*Immobilized Artificial Membrane*, IAM) kromatográfiás módszerrel jelezhető előre [35, 36]. A komponensek molekulatömeg szerinti frakcionálása célszerűen az előző módszerekhez kapcsolt

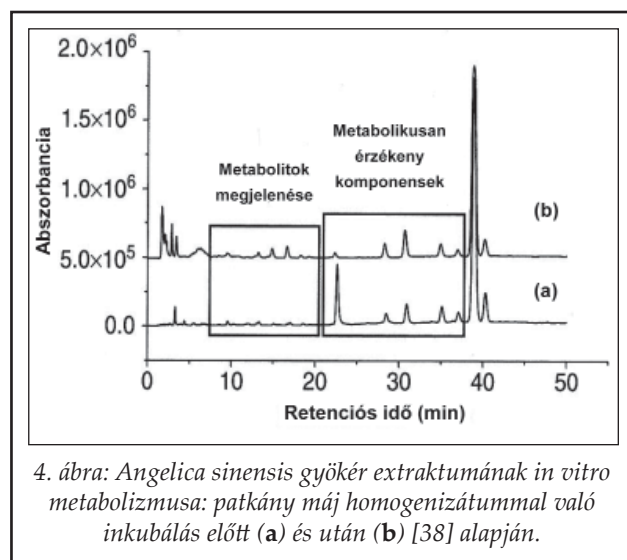
tömegspektrométer segítségével történhet. E megközelítésre példaként a 2. ábrán, a Richter extraktum-könyvtárban fellelhető *Solanum dulcamara* kloroformos kivonatának LC-MS kromatogramját (a, b) és az így felvett polaritás (retenciós idő) – móltömeg (detektált  $[M+H]^+$ ) – összetétel (Area%) 3D profilját (c) mutatjuk be. Ezen ábrázolásmód lehetőséget ad a gyógyszerszerű komponensek, illetve az ubikviter/marker vegyületek felismerésére, de kemotaxonómiai „ujjlenyomatként” is hatékonyan használható.

A nyers növényi eredetű kivonat racionalizált előfrakcionálása történhet biológiai, illetve humán fiziológiás sajátság alapján is. A hatóanyagok szervezetben történő eloszlását nagymértékben befolyásolhatja affinitásuk mértéke a vérben nagy mennyiségben jelenlevő humán szérum albuminhoz (HSA). Ezen az alapon a növényi kivonatok előfrakcionálása, jellemzése 2D-HPLC segítségével történhet. Ennek során királis hordozóhoz kötött (immobilizált) HSA affinitás kolonnát és RP kolonnát alkalmaznak a 2D-s felbontáshoz [37]. A módszer előnye, hogy a kivonat komponenseit RP kolonna segítségével elsősorban lipofilitás, majd az immobilizált affinitás kolonna segítségével a



3. ábra: Hagyományos kínai gyógyászatban használt (*Rheum palmatum* L.) extraktum humán szérum albumin (HSA) affinitás – fordított fázisú kolonnán felvett 2D-HPLC kromatogramja, [37] alapján.





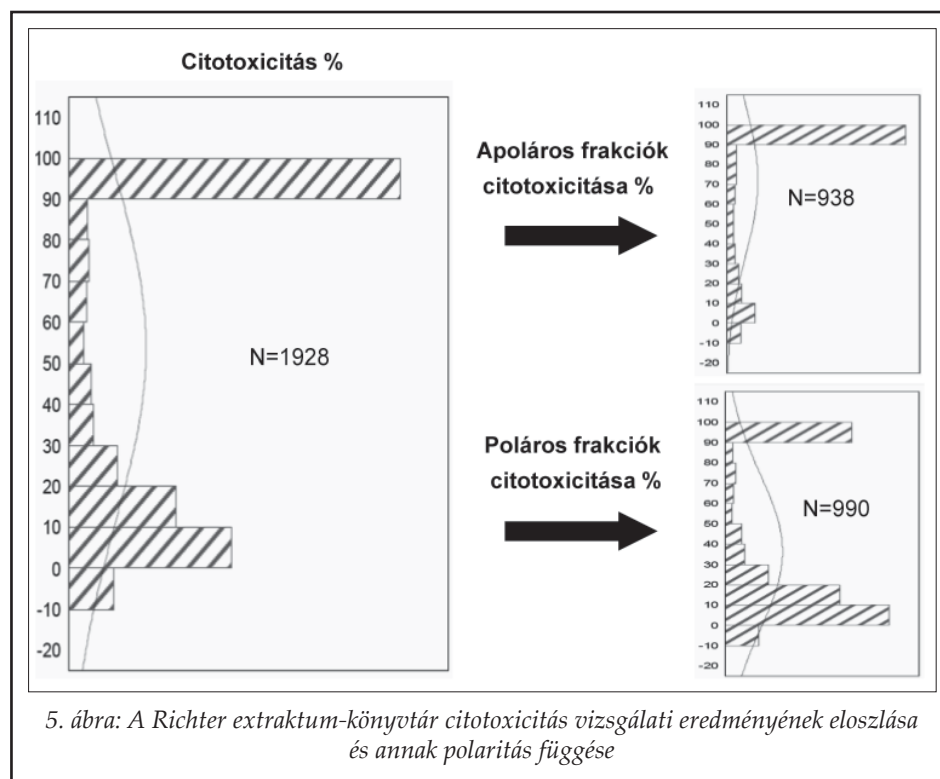
HSA kötődés alapján választja el. Ily módon a komponensek e két tulajdonság vetületében csoportosíthatóak, melyek közül farmakokinetikai szempontból a minél kisebb lipofilitású és egyben a HSA-hoz minél nagyobb affinitással kötődő komponensek lesznek az ideálisak (3. ábra). Kévsbé robosztus előfrakcionálást segítő biológiai szűrők a kivonat komponenseinek *in vitro* metabolizmusát, valamint citotoxicitását jellemző tesztszerek. A növényi kivonatok *in vitro* metabolizmusának vizsgálata, általában a gyógyszeripari standardnak megfelelően rágcsáló (patkány, egér), illetve humán máj mikroszóma frakció alkalmazásával, LC-UV-MS analitikai támogatás mellett történik. Ebben az esetben az egyes előfrakcionált izolátumok komponensei metabolikus érzékenyséjük alapján jellemezhetőek, összehasonlítva az eredeti és az *in vitro* metabolikus modellben történő LC-UV-MS kromatográfiás képük megváltozása alapján (4. ábra) [38]. A több, fokozott metabolikus érzékenyséű komponenst tartalmazó előfrakcionált kivonatok farmakokinetikai szempontból nem előnyösek, szelektálандóak a kivonatbankból. Itt kell megjegyezni, hogy a szintetikus vegyületekkel ellentétben a metabolikus átalakulás értékelése a növényi eredetű vegyületek esetében összetettebb feladat. A metabolikus átalakulás nem feltétlenül jelenti a biológiailag aktív komponens oxidatív lebontását. A növények másodlagos metabolitjai között számos cukor észter vegyület fordul elő, amelyek hidrolízise preszisztémásan, jellemzően a bélflóra baktériumainak révén megy végbe és csak az aglikon rész szívódik fel, azaz e komponensek egyfajta prodrug-ként értelmezhetőek [39]. Ennek megfelelően növényi extraktumok metabolikus folyamatai-

nak vizsgálata során, a keletkező metabolitok vizsgálata, azonosítása is fontos lehet. A kivonatok citotoxicitásának előrejelzésére számos, különböző sejtvonalon beállított *in vitro* modell áll rendelkezésre. Előszűrésre alkalmas robosztus módszer a sósvízi garnéla lárváin végzett letalitásvizsgálat (BSLT – *brine shrimp lethality test*) [40], amelyet szofisztikáltabb és a differenciálást elősegítő szűrés követhet (pl.: humán sejtvonalakon MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) kolorimetriás teszt alapján [41, 42]). Ily módon ezek a tesztek, a citotoxikus hatás rámutatásával segítenek azon izolátumok kiszűrésében, amelyek a sejt alapú HTS vizsgálatokban hamis, nem megfelelően értelmezhető eredményt szolgáltatnak, de egyúttal jó eszközök lehetnek a különböző humán rákos sejtvonalakban azonosított citotoxikus hatás alapján, a gyógyszerkutatási szempontból értékes hatóanyagot tartalmazó frakció azonosítására is.

Fentiek alapján, ideális esetben az előfrakcionálást követően, dereplikált (ubikviter anyagoktól mentes), komponensei analitikai sajátosságát tekintve könnyen elválasztható, fizikai-kémiai és metabolikus tulajdonságuk alapján megfelelő farmakokinetikai jellemzővel rendelkező, nem citotoxikus izolátumok állnak elő. A megközelítés előnye, hogy közepes idő és anyagi befektetés mellett, már bizonyos mértékben a gyógyszerkészítést is figyelembe véve készülnek el a HTS vizsgálatokhoz a növényi eredetű minták. Fontos az előnyök között kiemelni, hogy az előfrakcionálás során a II. típusú mintaelőkészítéssel nem csak a *major*, hanem a *minor* másodlagos metabolitok is benne maradhatnak a mintában, hiszen első körben nincs szükség a tisztításra, szerkezetazonosításra. A megközelítés egyedüli hátrányát a HTS vizsgálatot követő biológiailag aktív komponens azonosításának időigénye jelenti, ami elsősorban a kombinatorikus szintetikus kémiai könyvtárral való összehasonlításban, versenyhelyzetben ölt testet.

### 3.3. III. stratégia: tiszta komponens könyvtár

A III. típusú, tiszta növényi eredetű komponens könyvtár létrehozásának izolátum, illetve jelen esetben vegyület kiválasztási elve megegyezik a II. típusú előfrakcionálásnál megfogalmazottakkal, amit elsősorban a tiszta komponens izolálásához szükséges analitikai technika korlátai befolyásolnak. A tiszta komponens könyvtár létrehozásának limitációját az új kémiai entitást hordozó és a



többszörös HTS vizsgálathoz szükséges megfelelő tisztaságú (>80%) és anyagmennyiségű (1-5 mg) [43] növényi másodlagos metabolit izolálása jelenti. E kritériumok mellett a könyvtár méretét elsősorban az izolálásra fordított idő és a tisztítási lépésekhez felhasznált analitikai technikák befolyásolják, melyek összességében a ráfordított költségekkel párhuzamosan növekednek. Emiatt már az izolálási stratégia kidolgozásakor fontos eldönteni, hogy mekkora anyagi, illetve időbeli ráfordítást hajlandó egy kutatási projekt áldozni a növényi eredetű vegyület számának növelése érdekében. Jó példa ezen tényezők figyelembevételével létrehozott természetes eredetű molekulabankra az AnalitiCon Discovery és az Aventis Pharma együttműködésének eredménye [9]. A két cég által kitűzött cél közel 1800 db tiszta komponens izolálása volt 18 hónap alatt. A növényeket kemotaxonomiai alapon választották ki. A kemotaxonomiai bizonyosságot és a minél gazdagabb kémiai teret alaposan vizsgált és diverz bioszintézisű növénycsaládok kiválasztásával igyekeztek biztosítani. Annak érdekében, hogy csökkentsék a már leírt vegyületek „újraizolálását” az ismert növénycsaládokból olyan növényfajokat választottak, melyeket részletesen még nem vizsgáltak. Ennek megfelelően 124 db családból 679 db növényfaj gyűjtését célozták meg. Fenti számok alapján látható, hogy az egyes növényi drogokból mintegy

3-5 db másodlagos metabolitot terveztek izolálni, melyhez egyenként szárazanyagra nézve 500 g mintát gyűjtöttek össze. A hatékonyság növelésének érdekében a drogokból készült nyers extraktumokat LC-UV-MS technika segítségével, a már az előfrakcionálásnál leírt elveknek megfelelően, jellemezték. A profilírozási lépés eredményeképpen, melynek segítségével elsősorban az ubikviter vegyületektől kívántak megszabadulni, kiválasztották azokat a kivonatokat, amelyekből jó eséllyel tudnak megadott számú és mennyiségű tiszta komponenszt izolálni. A komponensek

izolálása és dúsítása standardizált preparatív kromatográfiás rendszerrel sorba kapcsolt szilárd fázisú extrakció segítségével történt [44]. Itt kell megjegyezni, hogy a növényi eredetű vegyületek izolálása éppen a szintetikus molekuláktól való szerkezeti eltérések miatt túlmutat a már gyógyszeriparban általánossá vált kromatográfiás technikákon: az ellenáramú folyadék-folyadék kromatográfia (CCC) [45, 46], és a nagyteljesítményű vékonyréteg-kromatográfia (HPTLC) [47] emelhető ki, mint a növényi eredetű vegyületek izolálásában nagy teret nyert elválasztástechnikák. Az izolált tiszta komponenseket a szerkezet meghatározás előtt újravizsgálták LC-UV-MS technikával az ismétlődő vegyületek kiszűrése érdekében. A közel 1800 db egyedi komponensből mintegy 180 db vegyület volt, amely 2-3-szor és 30-nál kevesebb, amely 4-30-szor ismétlődött. Ezt követően azonosították az ubikviter anyagoktól és vegyületismétlődéstől mentesített tiszta komponensek szerkezetét. A szerkezet felderítés LC-UV-MS, illetve LC-NMR kapcsolt technikával történt. A szerkezet azonosítás elvi hátterére a HTS találatok szerkezet meghatározási módszereinél térünk ki részletesen. Összességében elmondható, hogy a III. típusú, tiszta komponens izolálási stratégia előnye, hogy a HTS biológiai szűrés után egyből azonosítható a hatásért felelős komponens, így a létrehozott molekulabank már hasonló időbeosztás sze-

rint halad a kutatási kaszkádban, mint a szintetikusan előállított vegyületeket tartalmazó molekulabankok.

Figyelembe véve az 1999-2001 között rendelkezésre álló analitikai és az akkor még csak tervezett HTS eszközparkot, illetve a tervezett finansziális és időráfordítást, a Richter Gedeon Nyrt. és az együttműködő farmakognózia intézetek a begyűjtött drogokból nyert nyers extraktumokból a II. típusú kivonat készítési stratégiának megfelelően előfrakcionált mintákat hoztak létre a későbbi biológiai HTS vizsgálatokhoz. Ennek eredményeképpen, preparatív oszlopkromatográfia segítségével 1928 db, egyenként 5-10 db komponenst tartalmazó előfrakcionált izolátumot sikerült előállítani. Ezt követően a tervezett HTS funkcionális biológiai teszteredmények bizonytalanságának csökkentése érdekében a kapott előfrakcionált izolátumok citotoxikus hatását vizsgáltuk. A citotoxicitási szűrés után 1564 db extraktumot különítettünk el HTS vizsgálatra. A vizsgálat arra is rámutatott, hogy a jellemzően apoláros kivonatok (kloroformos előtisztítási út) nagyobb számban mutattak citotoxikus hatást, mint a polárosak (metanolos előtisztítási út) (5. *ábra*).

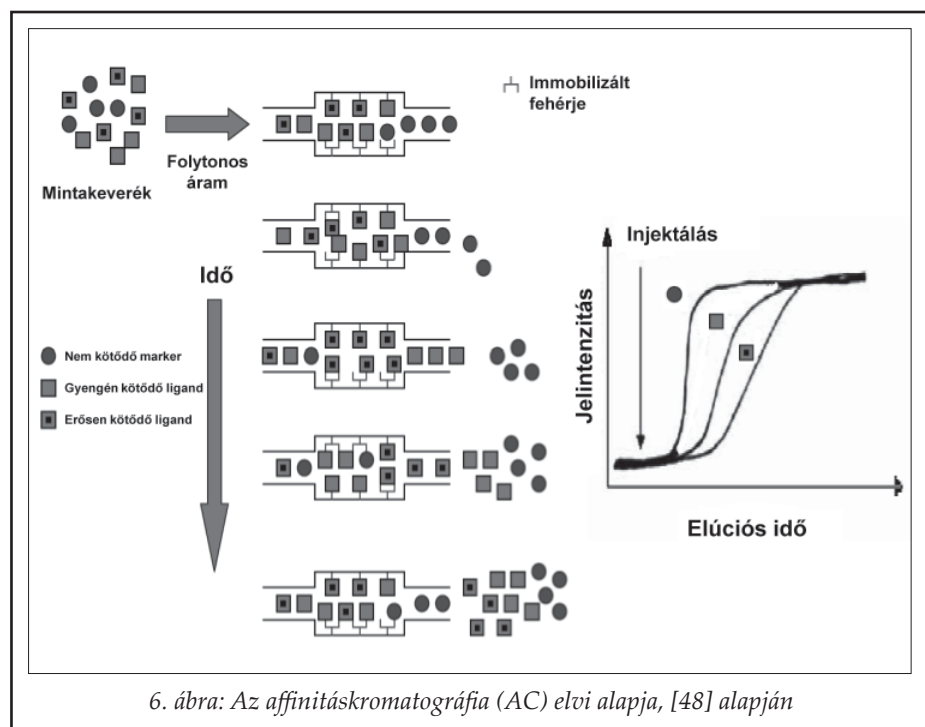
#### 4. Növényi eredetű minták HTS szűrése, az aktív komponens azonosítása

A növényi kivonatok HTS alapú biológiai hatásazonosítását és főként az ezt követő aktív komponens azonosításának analitikai megoldását nagymértékben meghatározza, hogy melyik, a fentiekben vázolt kivonat izolálási megközelítés kerül kiválasztásra. A különböző tisztaságú I. és II. típusú, nyers és előfrakcionált kivonatok adott biológiai célponton aktivitást mutató komponensének azonosítása jelentős, elsősorban analitikai kihívást jelent. Alapvetően két megközelítés ismert az aktív komponens azonosítására. Az egyik esetben a biológiai HTS vizsgálatából származó növényi eredetű vegyületek keverékét tartalmazó találatokból a hatóanyag hagyományos módon preparatív elválasztási műveletek és a biológiai hatás azonosítására irányuló vizsgálatok segítségével, több iterációs lépésben áll elő. Az azonosított biológiai hatással rendelkező izolátum frakciókra történő felosztása főként preparatív LC felhasználással történik. Ezt követően az egyes frakciók közül annak a mintának az elválasztását érdemes folytatni további alfrakciókra, ami az egyedi vagy közepes áteresztésű biológiai vizsgálatban (*Middle Throughput Screening*, MTS) aktivi-

tást mutat. Ennél a hagyományosnak tekinthető megközelítésnél az aktív komponens azonosításában előrelépés csak az elmúlt tíz év nagyműszeres analitikájában bekövetkezett fejlődésnek köszönhetően valósult meg. Az egyre pontosabb molekulatömeget és finomszerkezeti információt adó nagy felbontóképességű MS [HR-MS: Q-TOF, FT-ICR (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*)], valamint a nagyteljesítményű NMR (600 – 800 MHz) készülékek és ezek LC-vel kapcsolt rendszerei lehetővé tették, hogy egyre kisebb tisztaságú és hatóanyagtartalmú mintákból lehetségessé vált az aktív molekula szerkezetének azonosítása, ami összességében jelentős idő és anyagi megtakarítást jelent. A másik esetben a biológiai szűrőrendszer van összekapcsolva valamilyen, általában kromatográfiás elválasztástechnikával, így egyetlen lépésben válik lehetségessé a több komponensű mintából a hatásért felelős vegyület azonosítása. A legismertebb ilyen analitikai megoldás az affinitás kromatográfia (AC), ahol a biológiai célpont makromolekulát (receptort, enzimet), illetve erre a fehérjére transzfektált sejt vonal izlátumát kötik a szilárd hordozóhoz [48] (6. *ábra*). Ennek megfelelően az AC során a vegyületek kromatográfiás visszatartását elsősorban a makromolekula – ligandum kölcsönhatás határozza meg. Ezzel a technikával nemcsak a növényi kivonat aktív komponensét lehet azonosítani, hanem lehetőség van az egyes hatóanyagok adott célpontra vonatkozó disszociációs állandójának ( $K_d$ ) a meghatározására is [48]. Ily módon a vizsgálatból nyert találatok között hatás alapú sorrendet is fel lehet állítani. Fontos megemlíteni, hogy 2010-ben sikerült első ízben G-fehérje-kapcsolt receptorok (GPCR) családjába tartozó fehérje (GPR17) ligandumjait azonosítani AC segítségével [49], ami megnyitja az utat növényi eredetű vegyületek hatásazonosítására ebben a kiterjedt és humán terápiás célpontként jelentős receptorcsaládban is. A növényi kivonatokra általában jellemző és széles körben vizsgált antioxidáns hatás meghatározását célzó, LC-vel kapcsolt szűrőrendszerek alkalmazására is számos példa ismert az irodalomban. E szabadgyökös rendszerekben az oxidatív ágens ( $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^\bullet$ , peroxil stb.) jelenlétét, illetve mennyiségét specifikus indikátor vegyületek (tiobarbitursav, luminol) segítségével lehet detektálni, míg a kivonat aktív komponenseit a LC-UV/ED (elektrokémiai detektor)/MS kromatogramon a jel fogyása vagy eltűnése (*missing peak*) alapján lehet azonosítani [50].

A III. típusú, tiszta növényi eredetű komponens könyvtár HTS szűréséből származó találatok ke-





zelése és értelmezése lényegében megegyezik a parallel szintézissel létrehozott, szintén egységes és megfelelő tisztaságú vegyületeket tartalmazó molekulabank taláataival, hiszen ebben az esetben nincs szükség a hatásért felelős komponens szerkezetének meghatározására, az már a kivonat előkészítése során megtörtént. Jelentős, elsősorban a molekulaszervezet összetettségéből fakadó, különbség van azonban a klasszikus kismolekulás és a növényi eredetű kivonatot tartalmazó molekulabankok szerkezetileg azonosított HTS taláatainak vezérmolekula kiválasztási és optimalizációs folyamatában. Az egyik legnagyobb problémát, ami kihat a vegyület fejleszthetőségére is, a növényi eredetű vegyületek gazdaságos előállítása okozza. A növényi eredetű másodlagos metabolitok előállítása hagyományosan a már fentiekben leírt izolálási eljárásokkal kvantitatív fitokémiai ismeretek alapján kiválasztott növények drogaiból, illetve sokszor 15-20 lépésből álló, a még napjainkban is komoly szerves kémiai kihívást jelentő totálszintézissel történik. A szintetikus megoldást nagyban megnehezíti a természetes vegyületekre jellemző összetett gyűrűrendszer és az egy molekulában előforduló sztereocentrumok nagy száma is. Az elmúlt évtizedben a biotechnológia előretörésének és fejlődésének köszönhetően a növényi eredetű vegyületek gazdaságos előállítása már megoldható bioreaktorokban genetikailag módosított növényi sejtenyészetek felhasználásával is [51-53]. Hasonlóan a biológiai HTS taláatok közül kiemelt kis-

molekulás parallelszintézissel előállított vegyületekhez, illetve az ezekből kialakított vezérmolekulákhoz, a növényi eredetű másodlagos metabolitok esetében is szükség lehet hatás-, illetve farmakokinetikai sajátságok optimalizálása érdekében szerkezetmódosításra, ami elsősorban szintetikus kémiai lépések segítségével hajtható végre. Ily módon a kiválasztott vezérmolekula, illetve a klinikai kandidátus, félszintetikus úton állítható elő a natív, természetben előforduló anyavegyületből [54-56].

A Richter Gedeon Nyrt.-ben a növényi drogok izolálásánál már bemutatott, mintegy 1928 db előfrakcionált növényi kivonatot egy GPCR-kapcsolt receptorhoz („A” projekt), majd a citotoxicitás szűrésnek köszönhetően a megmaradt 1564 db mintát egy, az előzőtől független GPCR-kapcsolt receptorhoz („B” projekt) és egy ioncsatorna fehérjéhez („C” projekt) köthető sejtes funkcionális HTS szűrési kampányokban vizsgáltuk. Összehasonlítva az ezeken a HTS szűréseken szintén vizsgált kismolekulás könyvtár illetve az extraktumkönyvtár eredményeit a következő megállapításokat tehetjük (**III. táblázat**). A növényi kivonatok esetében mind a három projektnél közel egy nagyságrenddel nagyobb elsődleges HTS taláati arányt tapasztaltunk, mint a megfelelő kismolekulás könyvtárnál. A citotoxicitás szűrést követően („B” és „C” projekt) az elsődleges taláati arány a növényi extraktumoknál közel egyharmadára csökkent, ami bizonyítékul szolgál arra, hogy a racionalizálási törekvésünk hatékony volt, illetve ezzel együtt a már korábban megfogalmazott alpozitivitás valószínűsége lecsökkent. A növényi és kismolekulás minták megerősített taláati arányainál nem sikerült azonosítani ilyen egyértelmű összefüggést, a kapott eredmények inkább a biológiai szűrési rendszertől való függést mutatják. A bemutatott három projekt esetében a hatásért felelős komponenseket az ismertített iterációs megközelítéssel terveztük azonosítani, amihez a Richterben rendelkezésre álló legmodernebb nagyműszeres analitikai hátteret, azaz LC-FT-ICR-MS, illetve LC-

## III. táblázat

A Richterben végzett HTS kampányok találati arányainak összevetése

Projekt / Target	Primer találati arány		Megerősített találati arány	
	Kismolekulás	Növényi extraktumok	Kismolekulás	Növényi extraktumok
A (GPCR)	1,1%	14,6%		
B (GPCR)	0,3%	4,8%	83%	17%
C (ioncsatorna)	0,7%	5,1%	32,1%	63,5%

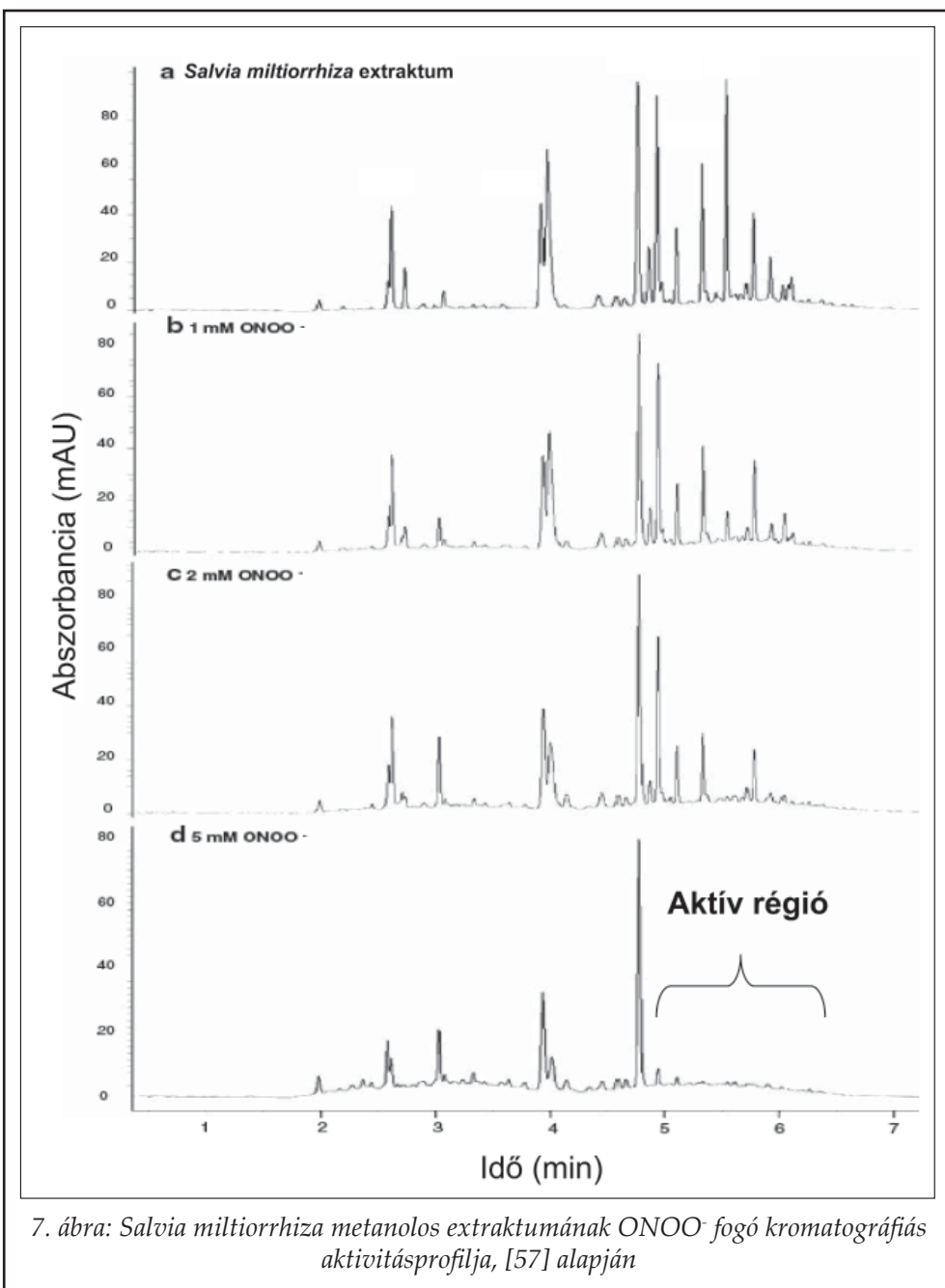
SPE (szilárd fázisú extrakció) - NMR (800 MHz) kapcsolt rendszereket használjuk.

Az extraktumok aktív szabadgyök-fogó komponenseinek azonosítására kialakítottunk egy új, LC-vel kapcsolt analitikai rendszert is, ahol a szabadgyökös folyamatokban jelentős szerepet játszó peroxinitriltel (ONOO<sup>-</sup>) szembeni antioxidáns hatás azonosítását a kromatográfiás csúcsterület csökkenése teszi lehetővé [57] (7. ábra). Ennek értelmében a példa-kromatogramon a 4,8 perc retenciós idő után eluálódó komponensekhez rendelhető a *Salvia miltiorrhiza* metanolos extraktumának aktivitása.

### 5. Következtetések

Az elmúlt 20 évben a túlnyomórészt természetes vegyületekből kiinduló gyógyszerkutatási stratégiát fokozatosan felváltotta a parallel szintézissel előállított vegyületbankok nagy áteresztőképességű biológiai vizsgálatokkal történő tesztelése. A főként növényi eredetű vegyületekre irányuló gyógyszerkutatás viszszafejlődése elsősorban a felgyorsult kutatási ütemtervnek volt

köszönhető, hiszen a növényi anyag gyűjtése és a hatóanyag izolálása igen időigényes. Ennek ellenére hamar kiderült, hogy a növényi eredetű vegyületek nagymértékű szerkezeti diverzitása és biológiai



7. ábra: *Salvia miltiorrhiza* metanolos extraktumának ONOO<sup>-</sup> fogó kromatográfiás aktivitásprofilja, [57] alapján

giai elővalidáltságából következő fokozott hatása miatt nem nélkülözhetőek napjainkban sem a gyógyszerkémiai térből. Az elmúlt években, elsősorban a nagyműszeres analitikában és elválasztástechnikában bekövetkezett változások megnyitották az utat a növényi, illetve egyéb természetes eredetű vegyületekből kiinduló gyógyszerkutatás újragondolásához. Összefoglaló munkánkban azokat az analitikai, valamint ezekkel összekapcsolt biológiai tesztrendszereket kívántuk bemutatni a nemzetközi és saját gyakorlatunkból, melyek felhasználásával a növényi eredetű hatóanyagok valós alternatívaként szolgálhatnak a parallel szintetikus vegyületek mellett napjaink gyógyszerkutatásában.

### Köszönetnyilvánítás

Az extraktum-könyvtár létrehozásában nyújtott alapos és kitartó munkájáért köszönetünket szeretnénk kifejezni *prof. Szőke Évának, prof. Lemberkovics Évának, prof. Kéry Ágnesnek, prof. Hohmann Juditnak, prof. Máthé Imrének, prof. Szabó Lászlónak, Kocsis Ákosnak és Engel Ritának*. Az extraktumok analitikai vizsgálataiban való közreműködéséért *Meszlényiné Sipos Mártának és Rill Attilának*, míg biológiai tesztelésükért *Visegrády Andrásnak, Kolok Sándornak és Tóth Szilviának* tartozunk köszönettel. *Keserű György Miklósnak* munkánk ösztönzéséért és hasznos tanácsaiért, míg *Bielik Attilának* a kézirat gondos átolvasásáért mondunk köszönetet. A publikáció a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj támogatásával készült.

### IRODALOM

1. Newmann, D. J., Cragg, G. M.: J. Nat. Prod. 70, 461-477 (2007).
2. Peterson, I., Anderson E. A.: Science 310, 451-453 (2005).
3. Wilson, R. M., Danishefsky, S. J.: J. Org. Chem. 71, 8329-8351 (2006).
4. Wessjohann, L. A.: Curr. Opin. Chem. Biol. 4, 303-305 (2000).
5. Voigt, J. H., Beinfait, B., Wang, S., Nicklaus, M. C.: J. Chem. Inf. Comput. Sci. 41, 702-712 (2001).
6. Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A. M., Cavrini, V.: J. Pharm. Biomed. Anal. 29, 691-700 (2002).
7. Prajapati, N. D., Purohit, S. S., Sharma, A. K., Kumar, T.: Harvest technology and value addition of medicinal plants. In: A Handbook of Medicinal Plants – A Complete Source Book. Agrobios, India 2009. pp. 140-169.
8. Lam, K. S.: Trends Microbiol. 15(6), 279-289 (2007)
9. Bindseil, K. U., Jakupovic, J., Wolf, D., Lavayre, J., Leboul, J., van der Pyl, D.: Drug Disc. Today 6(16), 840-847 (2001).
10. Spjut, R. W., Perdue, A. R. E.: Cancer Treat. Rep. 60, 979-985 (1976).
11. Gaillard, Y., Pepin, G.: J. Chromatogr. B 733, 181-229 (1999).
12. Gazim, Z. C., Amorim, A. C. L., Hovell, A. M. C., Rezende, C. M., Nascimento, I. A., Ferreira, G. A., Cortez, D. A. G.: Molecules 15, 5509-5524 (2010).
13. Wichtl, M.: Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. Norman Grainger Bisset (ed.), Medpharm Scientific Publishers, Boca Raton 1995.
14. Prajapati, N. D., Purohit, S. S., Sharma, A. K., Kumar, T.: A Handbook of Medicinal Plants – A Complete Source Book. Agrobios, India 2009.
15. WHO monographs on selected medicinal plants Vol. I-IV. World Health Organization, Geneva, 1999-2005.
16. Szabó, L. Gy.: Gyógynövényismeret biológus és biológia tanár szakos hallgatóknak. (egyetemi jegyzet) <http://www.ttk.pte.hu/biologia/novet>, 2006.
17. Zhu, M., Phillipson, J. D., Greengrass, P. M., Bowery, N. E., Cai, Y.: Phytochemistry 44, 441-447 (1999).
18. Rishton, G. M.: Drug Discov. Today 2, 382-384 (1997).
19. Avery, V. M., Camp, D., Carroll, A. R., Jenkins, I. D., Quinn, R. J.: The Identification of Bioactive Natural Products by High Throughput Screening (HTS). In: Mander, L., Lui, H.-W. (eds): Comprehensive Natural Products II; Chemistry and Biology. Elsevier, Oxford, 2010. Vol. 3., pp. 177-203.
20. Pertwee, R. G.: Br. J. Pharmacol. 153, 199-215 (2008).
21. Ma, X., Tan, C., Zhu, D., Gang, D. R. Xiao, P.: J. Ethnopharmacol. 113, 15-34 (2007).
22. Kim, H. J., Baburin, I., Khom, S., Hering, S., Hamburger, M.: Planta Med. 74, 521-526 (2008).
23. VanMiddlesworth, F., Cannell, R. J. P.: Dereplication and Partial Identification of Natural Products. In: Natural Product Isolation, Vol. 4, Methods in Biotechnology. Humana Press, Totowa NJ., 1998. pp. 279-327.
24. Larsen, T. O., Hansen, M. A. E.: Dereplication and Discovery of Natural Products by UV Spectroscopy. In: Colegate, S. M., Molyneux R. J. (eds): Bioactive Natural Products - Detection, Isolation, and Structural Determination. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, 2008. pp. 221-245.
25. Kersten, R. D., Meehan, M. J., Dorrestein P. C.: Applications of Modern Mass Spectrometry Techniques in Natural Products Chemistry. In: Mander, L., Lui, H.-W. (eds): Comprehensive Natural Products II; Chemistry and Biology. Elsevier, Oxford, 2010. Vol. 9., pp. 389-456.
26. Diehl, B.: NMR Spectroscopy of Natural Substances. In: Holzgrabe, U., Wawer, I., Diehl B. (eds): NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis. Elsevier, Amsterdam, 2008. pp. 181-200.
27. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P. J.: Adv. Drug Del. Rev. 23, 3-25 (1997).
28. Oprea, T. I.: J. Comp-Aided Mol. Design 16, 325-334 (2002).
29. Hann, M. M., Oprea, T. I.: Curr. Opin. Chem. Biol. 8, 255-263 (2004).
30. Pardridge, W. M.: Adv. Drug Del. Rev. 15, 5-36 (1995).
31. Clark, D. E.: Ann. Rep. Med. Chem. 40, 403-415 (2005).
32. Lobell, M., Molnár, L., Keserű, G. M.: J. Pharm. Sci. 92, 360-370 (2003).
33. Feher, M., Schmidt, J. M.: J. Chem. Inf. Comput. Sci. 43, 218-227 (2003).
34. Valkó, K.: J. Chromatogr. A 1037(1-2), 299-310 (2004).
35. Lee, T. H., Aguilar, M. I.: Adv. Chromatogr. 41, 175-180 (2001).
36. Pidgeon, C., Ong, S., Liu, H., Qiu, X., Pidgeon, M.: J. Med. Chem. 38, 590-597 (1995).
37. Hu, L. H., Chen, X. G., Kong, L. Su, X. Y., Ye, M. L. Zou, H. F.: J. Chromatogr. A 1092, 191-200 (2005).

38. Kong, L., Yu, Z. Y., Bao, Y. M., Su, X. Y., Zou, H. F., Li, X.: *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 264-273 (2006).
39. Bokkenheuser, V. D., Shackleton, C. H. L., Winter, J.: *Biochem. J.* 248, 953-956 (1987).
40. Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., McLaughlin, J. L.: *Planta Med.* 45, 31-34 (1982).
41. Mosmann, T.: *J. Immunol. Methods* 65(1-2), 55-63 (1983).
42. Réthy, B., Csupor-Löffler, B., Zupkó, I., Hajdú, Zs., Máthé, I., Hohmann, J., Rédei, T., Falkay, G.: *Phytother. Res.* 21, 1200-1208 (2007).
43. Lane, S. J., Eggleston, D. S., Brinded, K. A., Hollerton, J. C., Taylor, N. L., Readshaw, S. A.: *Drug Discov. Today* 11(5/6), 267-272 (2006).
44. God, R., Gumm, H., Heuer, C., Juschka, M.: *G.I.T. Laboratory Journal* 3, 188-191 (1999).
45. Berthod, A., Ruiz-Ángel, M. J., Carda-Broch, S.: *J. Chromatogr. A* 1216(19), 4206-4217 (2009).
46. Marston, A., Hostettmann, K.: *J. Chromatogr. A* 1112(21), 181-194 (2006).
47. Cieřla, L., Waksmundzka-Hajnos, M.: *J. Chromatogr. A* 1216(7), 1035-1052 (2009).
48. Slon-Usakiewicz, J. J., Ng, W., Dai, J. R., Pasternak, A., Redden, P. R.: *Drug Discov. Today*, 10(6), 409-416 (2005).
49. Calleri, E., Ceruti, S., Cristalli, G., Martini, C., Temporini, C., Parravicini, C., Volpini, R., Massolini, G.: *J. Med. Chem.* 53(9), 3489-3501 (2010).
50. Niederländer, H. A. G., van Beek, T. A., Bartasiute, A., Koléva, I. I.: *J. Chromatogr. A* 1210, 121-134 (2008).
51. Cui, X. H., Chakrabarty, D., Lee, E. J., Paek, K. Y.: *Biores. Technol.* 101(12), 4708-4716 (2010).
52. Georgiev, M. I., Weber, J., Macluk, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83(5), 809-823 (2009).
53. Eibl, R., Eibl, D.: *Phytochem. Rev.* 7(3), 593-598 (2008).
54. Lee, K. H.: *J. Nat. Prod.* 73(3), 500-516 (2010).
55. Kumar, K., Waldmann, H.: *Angew. Chem.* 48(18), 3224-3242 (2009).
56. Simmonds, M. S. J.: *Drug Discov. Today* 8(16), 721-722 (2003).
57. Könczöl, A., Kéry, A., Keserű, G. M., Balogh, G. T.: *Chromatographia* 71(S1), 51-59 (2010).

Érkezett: 2011. január 21.

---



## Az egyensúlyi oldhatóság meghatározásának helyes gyakorlata

BAKA EDIT

*Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Budapest, Högyes Endre u. 9. – 1092**Levelezési cím: bakae@gytk.sote.hu*

### Summary

Baka, E.: *Good laboratory practice of equilibrium solubility measurement*

The biggest part of my PhD work was the standardization of the classical saturation shake-flask solubility method. During the experiments we examined systematically which parameters have significant influence on the solubility value and how large experimental error (standard deviation) is caused by them in the solubility method. Hydrochlorothiazide was used as model compound. Modification in temperature, sedimentation time, composition of aqueous buffer and the technique of separation of solid and liquid phases were found to influence the equilibrium solubility results strongly. However, variations in the amount of solid excess and stirring time were found to have less influence. Based on this standardization study, we developed a new shorter (36 hours) protocol for measurements of equilibrium solubility of drug molecules. The new protocol was validated with the aid of 6 structurally different compounds. The equilibrium solubility was measured by both (standard and new) protocols. The results were in good agreement, so the shorter protocol can be applied to measure the equilibrium solubility of drug compounds.

**Keywords:** solubility; saturation shake-flask method; hydrochlorothiazide; GLP

### Összefoglalás

Jelen közlemény a doktori munkám<sup>1</sup> legnagyobb részét képező téma kutatási eredményeit foglalja össze a klasszikus telítésses-rázótölcséres módszert befolyásoló tényezők vizsgálatáról hidroklorotiazid modellvegyületen. Szisztematikusan vizsgáltuk, mely tényezők és mekkora befolyással, hibaforrással bírnak a mérési módszerre. A vizsgálat során a hőmérséklet, az ülepítési idő, a tompítóoldat összetételének változása, valamint a szilárd és folyadék fázis elválasztásának módja erősen befolyásolták a termodinamikai oldhatósági eredményeket. Ugyanakkor a keverési idő és a szilárd anyagfelesleg mennyiségének változása nem volt jelentős hatással a termodinamikai oldhatóságra. A befolyásoló tényezők vizsgálata alapján kidolgoztunk egy új, rövidebb (36 órá) protokollt a gyógyszervegyületek egyensúlyi oldhatóságának mérésére, amelyet 6 különböző szerkezetű vegyület segítségével validáltunk. A régi és az új protokollal mért eredményeink jó egyezést mutattak, tehát az új, rövidebb protokoll alkalmas a vegyületek egyensúlyi oldhatóságának meghatározására. A közleményben felhívjuk a figyelmet a meghatározás kritikus elemeire és javaslatot teszünk a helyes gyakorlatra.

**Kulcsszavak:** oldhatóság; rázótölcséres módszer; hidroklorotiazid, helyes laboratóriumi gyakorlat

### Bevezetés

Az oldhatóságnak igen fontos gyógyszerészeti vonatkozásai vannak a gyógyszerkutatás, gyógyszerfejlesztés, gyógyszerformulálás, gyógyszerellenőrzés és a farmakológia területén. A vegyületek vízben való oldhatósága fontos a farmakokinetikai, stabilitási vizsgálatok és formulálási eljárások kivitelezése szempontjából. Az oldhatóság ismerete szükséges a gyógyszerformulálás optimalizálásához, a megfelelő segédanyagok és vivőanyagok megválasztásához, továbbá a megfelelő sóforma kiválasztásához [1-3] és a gyógyszergyártás során a gyártási folyamatok optimalizálásához.

<sup>1</sup> „Gyógyszerek oldhatóságának meghatározására alkalmas módszerek vizsgálata és fejlesztése.” Témavezető: Takácsné Novák Krisztina egyetemi tanár. Budapest 2010. Semmelweis Egyetem Gyógyszertudományok Doktori Iskola.

A gyógyszerforma, az összetétel és a gyártási technológia megválasztását preformulálási vizsgálatok előzik meg. Ez azt a fejlesztési szakaszt jelenti, amely alatt a hatóanyag fizikai és kémiai tulajdonságait derítik fel, hogy számára stabil és hatékony gyógyszerformát találjanak, ugyanis a nem megfelelően kiválasztott segédanyagok a gyógyszerkészítés során inkompatibilitást eredményezhetnek, amely a gyógyszer minőségének romlását vagy hatásának elvesztését eredményezheti. A formulálás a hatóanyagot tartalmazó megfelelő gyógyszerforma előállításának szakasza. Mind az oldatos, mind a heterogén szilárd készítmények esetén vizsgálják többek között a hatóanyag oldhatóságát különböző polaritású vizes és szerves oldószerekben. Ionizálható vegyületeknél az oldhatóság pH-függésének vizsgálata is szükséges.

Az oldhatóság a gyógyszerkönyvben is megjelenik, mint minőségi kritérium. Az Európai (Ph. Eur.)

és a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv (Ph. Hg. VIII.) szinte minden kémiai alapanyagnál vizsgálhatja az oldódást. Az oldódás ellenőrzése általános minőségi (azonossági és tisztasági) vizsgálat, eredményét különböző típusú szennyeződések befolyásolhatják.

Nem valószínű, hogy a gyógyszeriparban egy potenciális gyógyszerjelölt molekulából sikerül gyógyszert kifejleszteni, ha a molekula gyenge abszorpciós tulajdonsággal rendelkezik. A gyenge abszorpció egyik lehetséges oka a molekula csekély vízben való oldhatósága [4]. Ennél fogva nélkülözhetetlen a vegyületek vízoldhatóságának ismerete, mivel ez lehetővé teszi a farmakokinetikai paraméterek előrejelzését, és elősegíti az ígéretes gyógyszerjelölt molekula szelekcióját. Ennek a felismerésnek a következményeként került bevezetésre a BCS (*Biopharmaceutics Classification System*) szerinti osztályozás. A gyógyszerjelölt vegyületek (jó ill. rossz) oldhatóságán és (jó ill. rossz) permeabilitásán alapuló besorolás négy (I.-IV.) csoportot különít el, mely alkalmas annak megítélésére, hogy milyen felszívódás várható [5].

A gyógyszerkutatás felfedező (*discovery*) szakaszában az oldhatóság ismerete segíti a potenciális vezérmolekulák keresését és osztályba sorolását. A gyógyszerkutatás fejlesztési (*development*) fázisában az oldhatóságnak jelentős szerepe van a várható farmakokinetikai viselkedés (felszívódás, eloszlás, kiürülés) előrejelzésében és a gyógyszerre fejleszthetőség megítélésében. A gyógyszerkutatás fázisainak megfelelően a gyógyszervegyületek különböző oldhatósági értékeinek meghatározására van szükség. A gyógyszerkutatás felfedező fázisában a gyógyszerjelölt molekulák *kinetikai* oldhatóságát, a fejlesztési fázisban a vegyületek *termodinamikai* oldhatóságát határozzák meg.

Az irodalomban használt különböző terminológia és jelölések tisztázása érdekében az alábbiakban röviden összefoglalom az oldhatóság fajtáit és ezek definícióját.

#### *Termodinamikai (egyensúlyi) oldhatóság, $S$*

A termodinamikai oldhatóság számértéke megadja a termodinamikai egyensúlyban lévő heterogén, kétkomponensű rendszer (oldat és oldandó anyag) oldatfázisának koncentrációját. Értéke adott nyomáson és hőmérsékleten állandó, anyagi minőségre jellemző. Ionizálható molekulák esetében az oldhatóság pH-függést mutat.

#### *Kinetikai oldhatóság, $S^{APP}$*

A kinetikai oldhatóság nem azonos a termodinamikai (egyensúlyi) oldhatósággal. A kinetikai old-

hatóság a telített oldat koncentrációja adott időpillanatban, amikor először történik csapadékkiválás a még termodinamikai egyensúlyban nem lévő oldatban. Adott vegyület esetében a kinetikai oldhatóság mindig következetesen magasabb oldhatósági értéket jelent, mint az egyensúlyi oldhatóság.

#### *Intrinsic oldhatóság, $S_0$*

A szabad sav vagy bázis egyensúlyi oldhatósága azon a pH-n, ahol a vegyület nemionizált formában van jelen [6, 11].

#### *Oldékonyság*

Az oldékonyság<sup>2</sup> a gyógyszerkönyv tájékoztató adata, mely jól definiált jelzőkkel megadja azt az oldószer-intervallumot ml-ben, amelyben az anyag 1 grammnyi mennyisége feloldódik.

Az oldhatóság gyógyszerészetben betöltött jelentősége miatt számos módszert dolgoztak ki kísérletes meghatározására. Az *I. táblázat* ad áttekintést az alkalmazott módszerekről. Az újonnan kifejlesztett metodikák nagymértékben automatizáltak és kellő gyorsaságúak. Ugyanakkor megmaradt a régi klasszikus meghatározás (telítéses-rázótölcséres módszer) jelentősége is, amely etalonnak tekinthető az újabb módszerek kifejlesztéséhez. Annak ellenére, hogy ezt az eljárást évtizedek óta alkalmazzák a gyógyszervegyületek termodinamikai oldhatóságának mérésére, a kísérleti körülmények igen nagy változatossága jellemző [6-10] és az alkalmazott napi gyógyszeripari gyakorlat is jelentős eltéréseket mutat.

A módszer standardizálás hiánya [11], valamint a korábbi telítéses-rázótölcséres módszerrel végzett oldhatóság-meghatározási méréseink során felmerülő nehézségek vezettek ahhoz, hogy a módszert befolyásoló főbb tényezők feltárását, valamint a módszer standardizálását tűzzük ki munkánk céljául. További célunk volt egy új protokoll kidolgozása és validálása a rázótölcséres eljárásra. Ez utóbbi érdekében további 5 kiválasztott gyógyszervegyület termodinamikai oldhatóságát határoztuk meg mindkét (standard és az új) protokollal.

Jelen közleményben a rövidített protokoll használatát javasoljuk a gyógyszervegyületek oldhatóságának meghatározására, és a helyes gyakorlat érdekében szükséges körülmények (tompítóoldat, hőmérséklet, fázisválasztási technikák) fokozott

<sup>2</sup> Megjegyzendő, hogy ez a nyelvi megkülönböztetés oldhatóság és oldékonyság között csak a magyar nyelvben létezik, az angol mindkettőre *solubility* megnevezést használ. A különbségtétel csak a gyógyszerészeti tudományokon belül terjedt el, a kémiában általában vegyes használat figyelhető meg.

I. táblázat

Oldhatóság meghatározására használt módszerek

Módszer	S	Típus	„Detektor”	Érzékenység**
fázisoldhatóság	termodinamikai	nem HT*	gravimetria	mg/ml
hagyományos rázóttölcéses	termodinamikai	nem HT*	UV	1 µg/ml
miniatürizált rázóttölcéses	termodinamikai	HT*	HPLC-UV vagy LC/MS	1 µg/ml
generator column	termodinamikai	nem HT*	HPLC	0,1 µg/ml
µDISS	termodinamikai	nem HT*	UV	1 µg/ml
DTT	termodinamikai	nem HT*	potenciometria	5 ng/ml
CheqSol	termodinamikai	HT*	potenciometria	0,1 µg/ml
turbidimetriás	kinetikai	HT*	UV	5 µg/ml
nefelometriás	kinetikai	HT*	lézer nefelométer	5 µg/ml
µSOL	termodinamikai	HT*	UV	0,1 µg/ml
LYSA	termodinamikai	HT*	UV	µg/ml
PASS	termodinamikai	HT*	UPLC	mg/ml

\*HT: nagy áteresztőképességű

\*\*érzékenység: legkisebb mérhető mennyiség

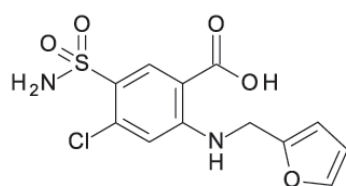
figyelembe vételére és körültekintő megválasztására hívjuk fel a figyelmet.

### Kísérleti rész

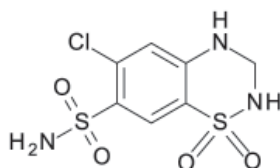
#### Vizsgált vegyületek

A rázóttölcéses módszert befolyásoló paraméterek vizsgálatához és standardizálásához a hidrokloro-

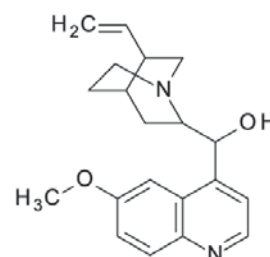
tiazidot választottuk modellvegyületnek. A telítéses-rázóttölcéses módszer új protokolljának kidolgozásához a hidroklorotiazid (Hungerpharma) mellett további 5 különböző szerkezetű vegyületet választottunk: furoszemid (Hungerpharma), kinin-hidroklorid (Reanal), nitrofurantoin (Reanal), piroxikám (Reanal) és trazodon (Sigma). A Gyógyszerkönyv 5.8. kiadásában is szereplő minták gyógyszerkönyvi tisztaságúak voltak és minden-



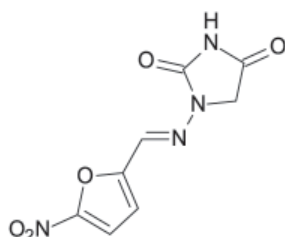
Furoszemid



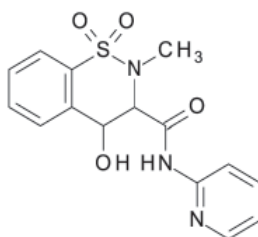
Hidroklorotiazid



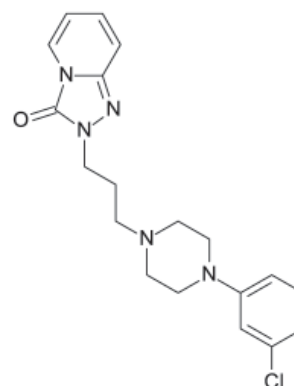
Kinin



Nitrofurantoin



Piroxikám



Trazodon

1. ábra: A vizsgált vegyületek szerkezete



ben megfeleltek a Gyógyszerkönyv által támasztott követelményeknek (1. *ábra*).

A különböző tompítóoldatok készítéséhez szükséges ecetsav (Reanal), foszforsav, bórsav, citromsav, kálium-dihidrogén-foszfát (Sigma), és dinátrium-hidrogén-foszfát (Sigma) analitikai tisztaságú volt. A rázótölcséres oldhatósági meghatározásokat 6,00-os pH-jú Britton-Robinson, Sörensen-foszfát vagy Sörensen-citrát tompítóoldatokban végeztük. A Britton-Robinson pufferoldat 0,04 M ecetsav, 0,04 M foszforsav és 0,04 M bórsav elegye, amelyet 0,2 M nátrium-hidroxid oldattal állítunk be a kívánt pH-ra. A Britton-Robinson tompítóoldat ionerőssége 0,089. A Sörensen-foszfát tompítóoldat elkészítéséhez 1/15 M dinátrium-hidrogén-foszfát és 1/15 M kálium-dihidrogén-foszfát oldat különböző arányú elegyét használtuk a kívánt pH értékeknek megfelelően. A Sörensen-foszfát tompítóoldat ionerőssége 0,076. A Sörensen-citrát tompítóoldatot 0,1 M nátrium-citrát oldat és 0,1 M nátrium-hidroxid oldat különböző arányú elegyítésével készítettük. A Sörensen-citrát tompítóoldat ionerőssége 0,318. Az oldatok elkészítéséhez gyógyszerkönyvi minőségű, frissen kiforralt és lehűtött desztillált vizet használtunk.

### *Műszerek*

A vizsgálatokhoz készített tompítóoldatok pH beállítását Radiometer PHM 220 pH mérő mellett kombinált Ag/AgCl üveg elektróddal végeztük (PHC 3359-9). A mérésekhez szükséges termosztált körülményeket Lauda termosztáttal biztosítottuk. Az oldhatóság vizsgálatok során a mintákban a fázisok kevertetéséhez Heidolph MR 1000 mágneses keverőt használtunk. A minták szűréséhez 0,45  $\mu\text{m}$ -es pórusátmérőjű Whatman PVDF membránszűrőt használtunk. A minták koncentrációjának mérését spektrofotometrián Jasco V-550 UV-VIS spektrofotométerrel végeztük. A vegyületek  $\text{pK}_a$  értékeinek (ionizációs konstans vagy savi disszociációs állandó) előzetes meghatározását GLpKa automata  $\text{pK}_a$  és logP mérő készülékkel (Sirius Analytical Instruments Ltd., UK) végeztük állandó hőmérsékleten ( $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ ), állandó ionerősség mellett (0,15 M).

### *Módszerek*

A vizsgált vegyületek  $\text{pK}_a$  értékeinek és típusának (sav, bázis, amfoter) ismeretében, a vegyületek egyensúlyi oldhatóságának meghatározását olyan

pH értéken végeztük, ahol a vegyület túlnyomórészt nemionizált formában van jelen. A savak esetében a mérés alacsony pH értéken, bázisok esetében magas pH értéken történt. Az amfoter molekulák esetében az izoelektromos pontnak megfelelő pH értéken végeztük a méréseket.

### *A fajlagos abszorpciós együttható meghatározása*

A klasszikus telítéss-rázótölcséres módszerrel a telített oldatok koncentrációját UV-spektrofotometrián mértük meg, ezért előtte meg kellett határoznunk a vegyületek fajlagos abszorpciós együtthatóját adott pH-n az alkalmazott tompítóoldatban. Ehhez a vizsgált vegyületekből ismert koncentrációjú oldatokat készítettünk Britton-Robinson, Sörensen-foszfát vagy Sörensen-citrát tompítóoldatban különböző beállított pH-kon. Ezután a törzsoldatokból hígítási sorozatot készítettünk, majd felvettük az UV-spektrumát (Jasco V-550 UV/Vis spektrofotométer). Ebből a sorozatból – melynél ismertük az oldatok abszorbananciáját és a hozzájuk tartozó koncentrációkat – a Lambert-Beer törvény alapján a mérési pontokból kalibrációs egyenest készítettünk. Az egyenes meredeksége adta a vizsgált vegyület fajlagos abszorpciós együtthatóját az adott pH-n az adott oldószerben. A fajlagos abszorpciós együtthatók meghatározását minimum két törzsoldatból és azok hígítási sorozatából (12-18 mérési pontból) végeztük.

### *Az oldhatóság meghatározása*

A telítéss-rázótölcséres módszer során a vizsgált anyagot üvegedényben lévő tompítóoldatban (Britton-Robinson, Sörensen-foszfát, Sörensen-citrát) oldottuk 5-10 ml térfogatban. Az oldatokat szilárd anyagfelesleg jelenlétében készítettük. Minden esetben az oldhatóság meghatározásához 3-6 mintát készítettünk. Az elkészített oldatokat 48 órán keresztül mágneses keverővel intenzíven kevertettük termosztált körülmények között az oldódási egyensúly eléréséig. Ha a vizsgált vegyület bomlékony vagy fényérzékeny volt, a szükséges mértékben csökkentettük a keverési időt. Az oldatokat pedig lehetőségekhez mérten fényvédett körülmények között kevertettük. Ha egy vegyület esetében kevésnek bizonyult a 48 óra az egyensúly beállásáig, növeltük a keverési időt.

Az oldatok kevertetése után, hogy a fázisok elváljanak egymástól és a tiszta telített oldatból mintát vehessünk, az oldatokat 24 órán keresztül üleptítettük termosztált körülmények között. Ha a

készített oldat nem tisztult fel teljesen, szükséges volt a fázisok szétválasztása szűréssel vagy centrifugálással.

A telített oldatok mindegyikének feltisztult részéből legalább háromszor vettünk mintát mikropipetták segítségével. A mikroliteres (5-500  $\mu$ l) mennyiségű mintákat szükség szerint hígítottuk. A három párhuzamos oldatból minden esetben legalább háromszor, legfeljebb hatszor vettünk mintát egy oldatból a mérés pontosítása érdekében.

A hígított minták abszorbanciáját UV-spektrofotométeren (Jasco V-550 UV/Vis spektrofotométer) mértük. A vegyületek már előzőleg meghatározott fajlagos abszorpciós koefficiense segítségével kiszámoltuk a minták koncentrációját. A kapott egyensúlyi oldhatósági eredmények minden esetben legalább 9 (legfeljebb 18) koncentráció meghatározás átlagából történtek.

#### a) Standard protokoll

A rázótölcséres módszert befolyásoló tényezők vizsgálatához ki kellett dolgoznunk egy eljárást, amelyben állandó körülményekkel dolgoztunk, és amelyet standard protokollnak neveztünk el. A befolyásoló tényezők vizsgálatához, minden esetben csak egy, a vizsgálni kívánt paramétert módosítottuk, a többi körülményt a standard protokollnak megfelelően alkalmaztuk.

A módszert befolyásoló tényezők vizsgálatát a hidroklorotiazid modellanyag segítségével végeztük. A standard protokoll során a hidroklorotiazidot minden esetben 6,00-os pH-jú Britton-Robinson tompítóoldatban oldottuk anyagfelesleg jelenlétében. A többi gyógyszervegyület oldhatóságát is Britton-Robinson tompítóoldatban végeztük a vegyületek nemionizált formájának megfelelő pH-n. Minden paraméter vizsgálatánál legalább három, legfeljebb hat oldatot készítettünk. A készített oldatokat termosztált körülmények között ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 48 órán át mágneses keverővel kevertettük. A fázisválasztást ülepítéssel végeztük 24 órán át termosztált körülmények között. Az oldatok koncentrációját UV-spektrofotométerrel mértük a megfelelő hígítás után.

#### b) Új protokoll

A telítéses-rázótölcséres módszert befolyásoló paraméterek vizsgálatát elvégezve, az eredmények kiértékelése után kidolgoztunk egy rövidebb mérési módszert, amelyet új protokollnak neveztünk el. Az új protokoll során az oldatkészítésnél minden esetben Britton-Robinson tompítóoldatot al-

kalmaztunk. Az oldatokat kis anyagfelesleg jelenlétében készítettük és 6 órán át termosztált ( $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) körülmények között mágneses keverővel kevertettük. A fázisválasztást 18 órás szedimentációval végeztük, amely után a felülúszó koncentrációját a megfelelő hígítás után UV-spektrofotométerrel mértük.

### Eredmények és értékelésük

#### 1. A telítéses-rázótölcséres módszert befolyásoló főbb kísérleti tényezők vizsgálata

Az oldhatóságot számos tényező befolyásolja, így a hőmérséklet, nyomás, a vizsgált vegyület tisztasága, pH, tompítóoldat összetétele vagy a vegyületre jellemző egyéb tulajdonságok (polimorfia, aggregáció, túltelített oldatképzés) [12, 13]. Ezek közül a rázótölcséres módszer kísérleti körülményeinek vizsgálata volt a célunk. Kísérleti munkánk során a következő körülmények vizsgálatára tértünk ki:

- oldószer,
- tompítóoldat összetétele,
- szilárd anyagfelesleg mennyisége,
- hőmérséklet,
- egyensúly beállításához szükséges idő,
- fázisok szétválasztásának módja.

A vizsgálat során a kísérleti körülményeket szisztematikusan változtattuk, figyelve: milyen mértékben befolyásolják a termodinamikai oldhatósági eredményeket a standard protokollal mért eredményekhez képest. A kísérlet során állandó körülményeket biztosítottunk és minden esetben csak egyetlen, a vizsgálni kívánt paramétert módosítottuk. Az állandó körülmények biztosításába beletartozott, hogy egy adott vegyület (modellvegyület) esetében végeztük a kísérleteket, kiküszöbölve ezzel a különböző oldhatósági értékeket.

#### Modellvegyület kiválasztása

A modellvegyület kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy szerkezetileg egyszerű, ionizálható csoporttal, valamint mérhető UV-aktivitással rendelkező gyógyszermolekulát válasszunk. További szempont volt, hogy stabil molekula legyen és nagy mennyiségű anyag álljon rendelkezésünkre belőle. Kritérium volt még, hogy vízben mérhető mennyiségben oldódjon, és a vegyület ionizált formája ne essen extrém pH tartományba. Választásunk a hidroklorotiazidra esett.

A hidroklorotiazid savi disszociációs állandóit ismerve ( $pK_{a1} = 8,75$ ;  $pK_{a2} = 9,88$ ) a vizsgálatokat

## II. táblázat

A hidroklorotiazid standard protokollal mért egyensúlyi oldhatósági értékei

	Párhuzamos minták				
	1	2	3	4	5
$\mu\text{g/ml}$	$556 \pm 12$	$547 \pm 7$	$540 \pm 2$	$563 \pm 8$	$573 \pm 14$
$\log S$ (Mol/l)	-2,73	-2,73	-2,74	-2,72	-2,72

olyan választott pH-n végeztük, amelyen a vegyület nemionizált formában van jelen. Az oldhatóság méréseket minden esetben 6,00-os pH-jú tompítóoldatban végeztük.

*Eredmények*

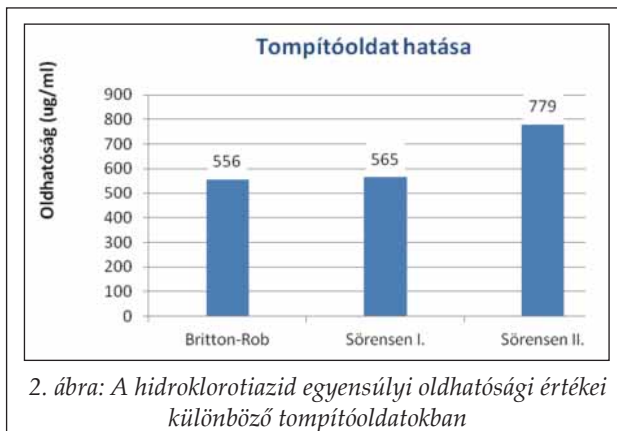
A kísérlet során először meghatároztuk a modellvegyület egyensúlyi oldhatóságát a *standard protokollban* leírt körülmények között. A hidroklorotiazid egyensúlyi oldhatósága (a mólkonzentráció logaritmusában kifejezve) a standard körülmények között  $\log S = -2,73 \pm 0,01$ -nek adódott ( $n = 18$ ). Az általunk mért oldhatósági eredmény jó egyezést mutat az irodalomban leírt eredményekkel:  $\log S = -2,67$  [14];  $\log S = -2,63$  [15];  $\log S = -2,63$  [16] (II. táblázat). Ezután vizsgáltuk a különböző paraméterek befolyásoló hatását az oldhatóságra. A vizsgálatok során minden esetben csak egy, a vizsgálni kívánt paramétert változtattuk, a többi körülmény a standard protokollban leírtaknak felelt meg.

*Oldószer, tompítóoldat hatása*

Az ionizálható vegyületek vízben való oldhatóságát pufferelt közegben mérik, mivel ezen vegyületek oldhatósága pH-függő. A gyenge savak és bázisok – a  $pK_a$  értéküknek megfelelően – különböző mértékben ionizálódnak a különböző pH-jú közegben [15-17]. Kísérleteink ezen részében nem az oldhatóság pH függését kívántuk tanulmányozni, vizsgálatunk a modellanyag intrinszc oldhatóságának mérésére fókuszálnak. Ezért a méréseket minden esetben 6,00-os pH-n végeztük.

A tompítóoldat összetételének, ionerősségének hatását az egyensúlyi oldhatóságra három tompítóoldat alkalmazásával tanulmányoztuk. Meghatároztuk a hidroklorotiazid egyensúlyi oldhatóságát Britton-Robinson, Sörensen I (foszfát) és Sörensen II (citrát) tompítóoldatokban

A 2. ábra jól szemlélteti, hogy a hidroklorotiazid egyensúlyi oldhatósága Britton-Robinson és a Sörensen I tompítóoldatban nagyon jó egyezést mutat, azonban Sörensen II pufferben a hidroklorotiazid egyensúlyi oldhatósága szignifikánsan magasabbnak adódott a másik két rendszerben mért értéknél. Az eltérés egyik oka lehet a tompító



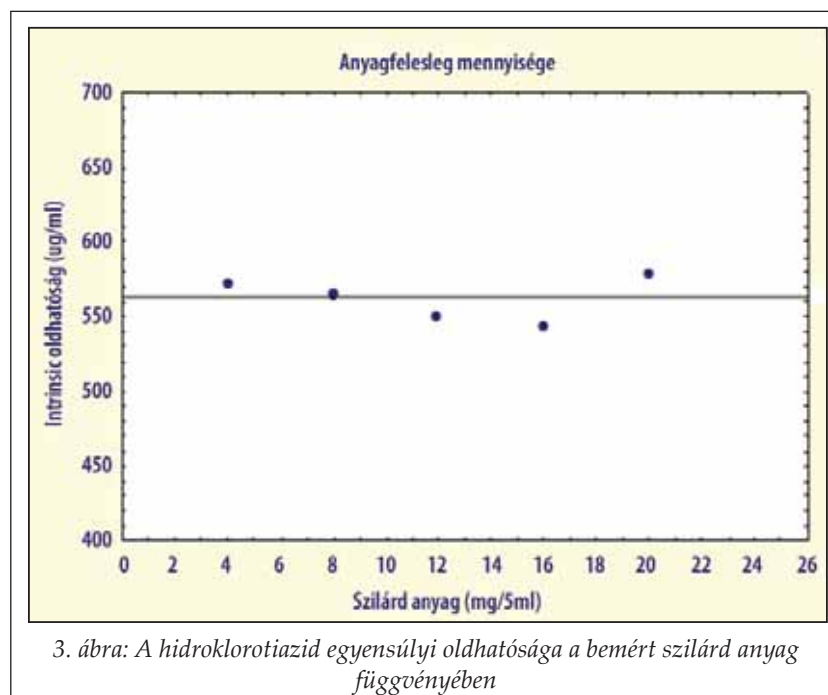
2. ábra: A hidroklorotiazid egyensúlyi oldhatósági értékei különböző tompítóoldatokban

oldatok eltérő ionerőssége: Britton-Robinson: 0,089, Sörensen-foszfát tompító oldat: 0,076 és Sörensen-citrát: 0,318. A Sörensen II puffer ionerőssége majdnem négyszerese a másik két rendszer ionerősségének. Ez a tény, valamint az, hogy a vizsgált anyag és a Sörensen II puffer citrát komponense között felléphet kölcsönhatás, lehetnek az okai a hidroklorotiazid magasabb oldhatósági értékének ebben a közegben.

*Szilárd anyagfelesleg mennyisége*

A második vizsgált paraméterünk a szilárd anyagfelesleg mennyiségének hatása volt a telített oldatban. Ahhoz, hogy az oldatban kialakuljon a termodinamikai egyensúly, heterogén rendszert kell biztosítanunk. Ehhez feltétlenül szükséges, hogy bizonyos mennyiségű szilárd anyag feleslegben legyen jelen az oldatban. Ezt a kérdést járja körül a Kawakami és munkatársai által publikált cikk [18], melyben a szilárd anyagfelesleg mennyiségének hatását írják le a látszólagos oldhatóságra. Megállapításuk szerint a szilárd anyagfelesleg a látszólagos oldhatóságot a kristályosodási és oldódási sebességen keresztül befolyásolja. Az irodalomban azonban nincs a szilárd anyagfelesleg mennyiségéről egyértelmű útmutatás, ezért kívántuk vizsgálni, mennyi szilárd anyag használata optimális a heterogén rendszerben a termodinamikai egyensúly biztosításához a telítéses-rázótöltés módszer során.

A vizsgálatokban 4 mg és 20 mg között, 4 mg-onként változtattuk a rendszerbe bemért anyagmennyiséget (3. ábra). A heterogén rendszerben



lévő szilárd anyag mennyisége – ha az megfelelően tiszta és homogén szemcseméret-eloszlású – szignifikánsan nem befolyásolja az egyensúlyi oldhatóságot. Ez a megállapítás nincs ellentmondásban a Higuchi és munkatársai [19] által tett megállapítással, miszerint a telített állapot megközelítésének végső sebessége közel egyenes arányban van a szilárd anyagfelesleg mennyiségének jelenlétével, vagyis minél nagyobb az anyagfelesleg, annál gyorsabb a telítődési sebesség. A gyengébben oldódó szilárd anyag határfelületén sokkal több anyagfelesleg mennyiség jelenléte szükséges a telített állapot eléréséhez, mint egy jobban oldódó szilárd anyag esetében.

A mérések során szerzett tapasztalatainkból adódóan azonban mindenképpen kis anyagfelesleg (5-10 mg/5ml) használatát javasoljuk a telítéses-rázótölcséres módszer során, hogy megkönnyítsük a mintavételt.

#### Hőmérséklet

Az oldhatóság hőmérséklet függése jól ismert jelenség. Az irodalomban leírt oldhatóság mérések mindegyike termosztált körülmények biztosítása mellett, állandó hőmérsékleten zajlik. Az irodalomban javasolt hőmérsékleti kontroll:  $\pm 2^\circ\text{C}$  értékben belül kielégítő [14].

A vizsgálatsorozat ezen részében összehasonlítottuk a hidroklorotiazid egyensúlyi oldhatóságát három különböző hőmérsékleten: 15, 25 és  $37^\circ\text{C}$ -on (III. táblázat).

A legtöbb gyógyszer az endoterm módon oldó-

dó vegyületek közé tartozik, azaz az oldhatóságuk nő a hőmérséklet emelkedésével. A hidroklorotiazid is ilyen anyag. Oldhatósága 15 és  $37^\circ\text{C}$  között szignifikánsan emelkedik, mégpedig oly mértékben, hogy a testhőmérsékleten ( $37^\circ\text{C}$ ) mért oldhatósága majdnem kétszerese a szobahőmérsékleten mért oldhatósági értéknek.

Általánosságban elmondható, hogy a legtöbb vegyületnek magasabb az oldhatósága testhőmérsékleten, mint  $25^\circ\text{C}$ -on, amely a rosszul oldódó gyógyszerhatóanyagok esetében előnyt jelenthet a gyógyszertervezésben, mivel a biohasznosíthatóságuk a szervezetben megnő. Ez a tény egyben arra is rávilágít, hogy a biomimetikus hőmérsékleten is célszerű oldhatóság

meghatározása a szobahőmérsékleten végzett vizsgálatok mellett.

#### Keverési idő

A telítéses-rázótölcséres módszerben az egyensúly kialakulásához két fontos, de igen különböző folyamat szükséges. Az egyik a fázisok érintkezése, agitálása valamilyen módon, kevertetéssel vagy rázatással, a másik pedig egy nyugalmi állapot, az üleptetés. A vizsgálatssorozat elvégzésével arra kerestük a választ, hogy vajon melyik folyamat játszik nagyobb szerepet az egyensúly kialakításában. Ennek érdekében a keverési időt és az üleptési időt egymástól függetlenül változtattuk.

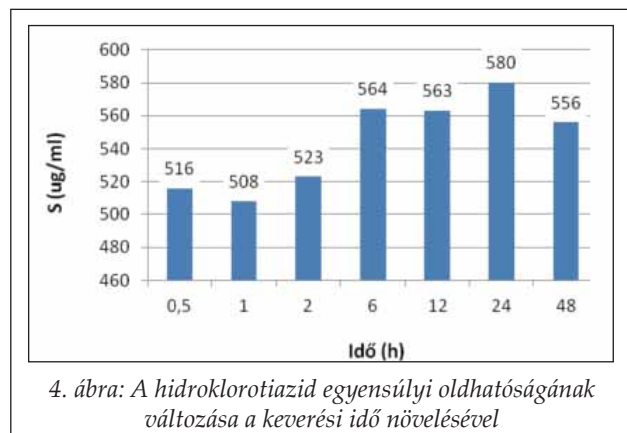
Először a keverési időket módosítottuk 0,5 és 48 óra között. Eredményeink szerint (4. ábra) a hidroklorotiazid oldhatósága egy ideig (6 óra) növekszik a keverési idő növelésével, majd elér egy maximumot. Az ezután mért oldhatósági eredmények már nem különböznek jelentősebben egymástól. Tehát a kísérletsorozatunk szerint, hat óránál kevesebb keverési idő nem elegendő az egyensúlyi oldhatóság eléréséhez az oldatban. Ennél hosszabb ideig kevertetett minták oldhatósági

#### III. táblázat

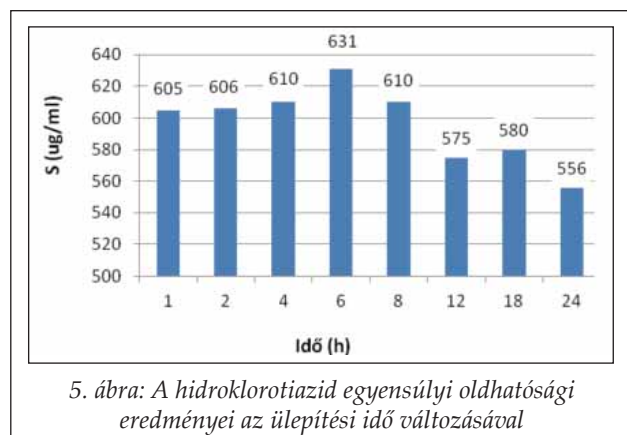
A hidroklorotiazid oldhatósága három különböző hőmérsékleten

Hőmérséklet	S ( $\mu\text{g/ml}$ )
$15^\circ\text{C}$	$450 \pm 20,3$
$25^\circ\text{C}$	$556 \pm 13,1$
$37^\circ\text{C}$	$1036 \pm 36,3$





4. ábra: A hidroklorotiazid egyensúlyi oldhatóságának változása a keverési idő növelésével



5. ábra: A hidroklorotiazid egyensúlyi oldhatósági eredményei az ülepitési idő változásával

eredményei nem változtak szignifikánsan a keverési idő növelésével. Az eredmények alapján nem szükséges 48 óra keverési idő az oldatban való telítési egyensúly beállításához a hidroklorotiazid esetében. Ezen tényező rövidebb időre való lecsökkentésével a telítési-rázótölcséres eljárás is lerövidíthető.

Mindezek ellenére, azonban fel kell hívjuk a figyelmet arra, hogy lehetnek olyan vegyületek – főleg a vízben gyengén oldódóak között –, amelyek esetében hosszabb keverési idő szükséges az egyensúly kialakulásához. Ha nagyon szigorú javaslatot, útmutatást akarunk adni a telítési-rázótölcséres módszer alkalmazásához, akkor minden egyes vegyület esetében meg kellene mérnünk az oldhatóságot növekvő keverési idő függvényében, hogy pontosan megmondhassuk, mely vegyület esetében mekkora keverési idő szükséges az egyensúly beállításához. Vizsgálataink eredményei alapján azonban javasoljuk a keverési idő hosszát legkevesebb 6 órával kezdeni.

#### Ülepitési idő

A telítési-rázótölcséres módszerben a termodinamikai egyensúly kialakulásához hozzájárul egy nyugalmi fázis is, amelyet az ülepités folyamatá-

val kivitelezünk. Az ülepités szerepének vizsgálatában, 1–24 óra között módosítottuk az ülepitési időtartamát (5. ábra).

A kísérlet során kapott eredmények éppen ellenkező tendenciát mutattak, amint a keverési idő esetében tapasztaltunk. A hidroklorotiazid oldhatósága az első 8 órás intervallumban magasabbnak bizonyult. Kezdetben túltelített oldat képződik, majd anyag válik ki és a rendszer lassan eléri a termodinamikai egyensúlyi állapotot.

Eredményeink arra utalnak, hogy a keverési idővel ellentétben az ülepités ideje erősen befolyásolja az egyensúlyi oldhatóság kialakulását, és hosszabb ülepitési idő szükségességét hangsúlyozzák a pontosabb mérés érdekében. Mindezek az eredmények azt is mutatják, hogy az ülepitési idő nagyobb szerepet játszik a termodinamikai egyensúlyi folyamat kialakulásában, mint a keverési idő.

#### Szilárd és folyadékfázist elválasztó technikák

A fázisok elválasztására alkalmazott technika kulcsfontosságú szerepet játszik a telítési-rázótölcséres módszerben. A minták kevertetése vagy rázatása után a két fázist (oldat és szilárd anyag) valamilyen módon el kell választanunk egymástól, hogy az oldat felülúszójából mintát vehessünk a koncentráció (UV-spektrofotometriás) méréshez. A koncentráció meghatározáshoz szükséges mintáknak teljesen tisztáknak, átlátszóknak és szilárd részecskéktől mentesnek kell lenniük.

A fázisválasztás elvégezhető ülepités nélkül, ekkor azonban kimarad a termodinamikai egyensúlyhoz szükséges nyugalmi állapot, amelyre a korábbi kísérleti eredmények utalnak. A szilárd fázis elválasztását a telített oldattól elvégezhetjük szűréssel vagy centrifugálással is közvetlenül a fázisok agitálása, érintkeztetése után. A vizsgálat során 12 mintát centrifugáltunk 2000-es fordulatszámmal 10 percen keresztül, és további 12 mintát szűrtünk le 0,45 µm pórusú membránszűrőn a fázisok elválasztása céljából.

A statisztikai kiértékelés (két mintás t-próba) alapján a hidroklorotiazid három különböző elválasztással kapott oldhatósági eredményei szignifikánsan különböznek (IV. táblázat).

IV. táblázat

Oldhatósági eredmények különböző fázisválasztások esetén

Fázisok elválasztása	S (µg/ml)
Centrifugálás	591 ± 15,4
Szűrés (0,45 µm)	661 ± 3,5

V. táblázat  
A telítéssel-rázótölcséres módszer új protokolljának  
körülményei

Új protokoll paraméterei	
Oldószer	Britton-Robinson tompítóoldat
Anyagfelesleg	kis anyagfelesleg
Hőmérséklet	25 ± 0,1 °C
Keverési idő	6 óra
Ülepítési idő	18 óra
Fázisválasztás	ülepítés
Koncentráció mérés	UV-spektrofotometria

A legnagyobb eltérést a standard protokollal kapott oldhatósági értéktől a szűréssel kapott eredmény mutatja. Ennek oka feltehetőleg az, hogy a szűrés közvetlenül a fázisok kevertetése után történik, és az így kapott minta koncentrációmeghatározását a kevertetést és a szűrést követően rövid időn belül elvégezzük. A fázisok kevertetése során valószínűleg túltelített oldat képződik. Következésképp, ha a mintának nem biztosítjuk a nyugalmi állapotot – amelyet a standard protokollban az ülepítés jelent – az agitációs szakasz után, akkor az így kapott oldhatóság érték magasabbnak adódik az egyensúlyi oldhatóságnál. A vizsgálatok során szerzett tapasztalataink alapján a szűrés, mint fázisválasztó technika alkalmazását javasoljuk a legkevésbé a telítéssel-rázótölcséres alkalmazásakor. Amellett, hogy közvetlenül az agitációs szakasz után végzett szűrés során az arra hajlamos vegyületeknél túltelített oldatot kapunk, a szűrés eljárás felborítja a heterogén rendszer egyensúlyát is, azáltal, hogy a szilárd anyag oldatban való jelenlétét megszünteti, és ezzel a termodinamikai egyensúlyhoz szükséges egyik tényezőt kiiktatja a rendszerből. A szűrésen átesett oldatból kapott oldhatósági eredményt szigorúan véve nem is nevezhetnénk egyensúlyi oldhatóságnak.

Mindent figyelembe véve az ülepítés tekinthető a legbiztonságosabb eljárásnak a fázisok elválasztására. Bizonyos esetekben – amikor ülepítéssel nem kapunk tiszta, átlátszó felülúszót –, ha példá-

ul a vegyület micellaképzésre, aggregációra, opaleszcens oldatképzésre hajlamos, a fázisválasztást nem lehet ülepítéssel megoldani, célszerű a centrifugálást választani.

## 2. Új protokoll kidolgozása és validálása

A telítéssel-rázótölcséres módszert befolyásoló főbb paraméterek vizsgálata, valamint a módszer során nyert gyakorlati tapasztalataink alapján egy új, rövidített protokollt dolgoztunk ki és azt validáltuk. Az új protokoll paramétereit az **V. táblázat** tartalmazza.

Az új protokollban a szélesebb pH tartományban használható, nagyobb pufferkapacitású Britton-Robinson tompítóoldatot használtuk. A méréseinket termosztált körülmények között szobahőmérsékleten végeztük. A termodinamikai egyensúly eléréséhez szükséges telítési idő 24 óra volt, amely 6 óra keverési időből és 18 óra ülepítési időből állt. Ezzel lerövidült az egyensúly elérésére fordított telítési idő a standard protokollhoz képest. Az új protokoll előnye, hogy jelentősen lerövidítette a módszer időigényét, a korábbi 3,5-4 nap helyett mindössze másfél nap kell egy vegyület egyensúlyi oldhatóságának meghatározására.

Az új protokoll alkalmasságának igazolására validálnunk kellett az eljárást. A validáláshoz megmértük a hidroklorotiazid és további öt vegyület egyensúlyi oldhatóságát mindkét protokollal. A mérések során a gyógyszermolekulák intrinszc oldhatóságát határoztuk meg. Ehhez a méréseket olyan választott pH-n végeztük, amelyen a vegyületek nemionizált formában vannak jelen. A pH értékek megválasztásához előzetesen meghatároztuk a vegyületek pontos savi disszociációs állandóit a korábban leírt potenciometriás eljárással. A rázótölcséres oldhatóságmérések előtt a megfelelő pH-n és a megfelelő tompítóoldatban meghatároztuk a vegyületek fajlagos abszorpciós együtthatóját. A teszt vegyületek savi disszociációs állandóit és spektrofotometriás paramétereit a **VI. táblázat** foglalja össze.

VI. táblázat

A vizsgálatban részt vevő teszt vegyületek  $pK_a$  értékei és spektrofotometriás adatai

Vegyületek	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	pH	$A^{1\%}_{1cm}$	$\lambda_{max}$
Nitrofurantoin (sav)	7,05		2,50	510 ± 35	265
Furoszemid (kétértékű sav)	3,60	10,15	2,00	1225 ± 20	234
Trazodon (bázis)	6,81		11,50	278 ± 10	246
Kinin (kétértékű bázis)	4,24	8,55	11,50	122 ± 3	329
Piroxikám (amfoter)	1,87	5,29	3,73	640 ± 3	361

VII. táblázat

A teszthevegyületek oldhatósági eredményei a két protokollal

Vegyületek	M <sub>w</sub>	Oldhatóság				n
		µg/ml	± SD	S (M)	logS (M)	
Standard protokoll						
Hidroklorotiazid	297,7	556	13,2	0,001868	-2,73	18
Furoszemid	330,8	20,4	2	0,000062	-4,21	8
Nitrofurantoin	238,2	109,5	3	0,000460	-3,34	8
Piroxikám	331,4	5,95	0,4	0,000018	-4,75	2
Kinin	360,4	201	10	0,000558	-3,25	6
Trazodon	371,4	138	10	0,000372	-3,43	6
Új protokoll						
Hidroklorotiazid	297,7	571	8,6	0,001918	-2,72	12
Furoszemid	330,8	18,7	1,2	0,000057	-4,25	8
Nitrofurantoin	238,2	99	4,1	0,000416	-3,38	8
Piroxikám	331,4	6,36	0,04	0,000019	-4,72	3
Kinin	360,4	285	30	0,000791	-3,10	5
Trazodon	371,4	176	1,8	0,000474	-3,32	12

A vegyületek fajlagos abszorpciós koefficiensének meghatározása után, megmértük az intrinsíc oldhatóságukat mind az új, mind a standard protokoll alapján. A kapott egyensúlyi oldhatósági eredményeket a VII. táblázat mutatja  $\mu\text{g/ml}$ -ben és kétféle logS értékben.

A vizsgált vegyületek közül négy esetben jó egyezést kaptunk a két protokollal mért oldhatósági eredmények között. A kinin-hidroklorid és a trazodon esetén nagyobb az eltérés az eredményekben, azonban a telítésses-rázótölcséres módszer hibáját tekintve ez a különbség még elfogadhatónak mondható. Következésképp, az új, rövidebb protokoll a vegyületek nagy részében alkalmas az intrinsíc oldhatóság mérésére. Bizonyos gyógyszerhatóanyagok esetében előfordulhat, hogy nem elegendő 24 óra a termodinamikai egyensúly kialakulásához, de ezen vegyületek esetében is az egyensúlyi oldhatóságukhoz közelítő, informatív eredményt kapunk. A pontosabb oldhatósági eredmény elérése érdekében ezen vegyületek esetében érdemes megnövelni a telítési időt. Az új protokoll előnye a lecsökkent időigénye, amellyel a korábbi 4 napos mérések másfél napra rövidültek.

### Következtetések

A telítésses-rázótölcséres módszer standardizálása 135 önálló beméréssel elkészített párhuzamos minta, és az oldhatóságot leginkább befolyásoló főbb paraméterek vizsgálatán alapult. A hőmér-

séklet, az ülepítési idő, a tompítóoldat összetétele, valamint az alkalmazott fázis-elválasztási technika erősen befolyásolja a mért egyensúlyi oldhatóságot. Az alkalmazott szilárd anyagfelesleg mennyisége ugyanakkor szignifikánsan nem befolyásolja az oldhatósági eredményeket.

Tapasztalataink alapján, összegzésként javasoljuk az egyes körülményekre való odafigyelést, valamint azok alkalmazását a telítésses-rázótölcséres módszer esetében:

- a méréseket minden esetben termosztált körülmények között, állandó hőmérsékleten kell végezni,
- a Sörensen-foszfát puffer használható pH 3 és 7 között, a Britton-Robinson tompítóoldat szélesebb pH tartományban (pH = 2,5-11,5) alkalmazható az egyensúlyi oldhatóságok vizes oldatban való mérésére, míg 2,0-es pH-n történő mérésekre használható a megfelelő koncentrációjú sósav oldat,
- a mintavétel nehézségeinek elkerülése végett, kevés mennyiségű szilárd anyagfelesleg jelenléte javasolt az oldatban (5-10 mg/5 ml),
- a termodinamikai egyensúly eléréséhez legalább 24 órás telítési idő javasolt, amely minimum 6 óra keverési időből és 18 óra ülepítési időből álljon,
- a fázis elválasztásának legbiztonságosabb módja az ülepítés, amely egyben szorosan hozzá is járul a termodinamikai egyensúly kialakulásához a heterogén rendszerben.



Ha a fent javasolt körülményeket szigorúan betartjuk, az oldhatóság mérések kísérleti hibája 4% alá csökkenthető. A telítéses-rázótölcséres módszer új protokolljával a vegyületek egyensúlyi oldhatósága másfél nap alatt meghatározható.

### IRODALOM

1. Anderson, B.D., Flora, K.P.: Preparation of water-soluble compounds through salt formation, in: Wermuth C. G. (Ed.) The Practice of Medicinal Chemistry. Academic Press, London, 1996. 739-754.
2. Serajuddin, A.T.M., Pudipeddi, M.: Salt selection strategies, in Stahl P. H., Wermuth C.G. (Eds.), Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, Wiley-VCH, Weinheim, 2002, 135-160.
3. Stahl, P.H.: Salt selection, in Hilfiger R. (Ed.), Polymorphism in pharmaceutical industry, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, 309-322.
4. Hörter, D., Dressmann, J.B.: Adv. Drug Deliv. Rev. 25, 3-14 (1997).
5. Lobenberg, R., Gordon, A.L.: Eur. J. Pharm. and Biopharm. 50, 3-12 (2000).
6. Lipinski, C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J.: Adv. Drug Deliv. 46, 3-216 (2001).
7. Ekzweiler, F., Senn, E., Schmidt, H.W.H.: Anal. Chem. 67, 655-658 (1995).
8. Mora, C.P., Martínez, F.: Fluid Phase Equilib. 255, 70-77 (2007).
9. Grant, D.J.W., Higuchi, T.: Solubility Behavior of Organic Compounds, Wiley, New York, 1990.
10. Streng, W.H.: Characterization of Compounds in Solution – Theory and Practice, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2001.
11. Box, K.J., Völgyi, G., Baka, E., Stuart, M., Takács-Novák K., Comer J.E.A.: J. Pharm. Sci. 95, 1298-1307 (2006).
12. Avdeef, A.: Wiley-Interscience, New York, 2003.
13. Yalkowsky, S.H., Banerjee, S.: Marcel Dekker Inc., New York, 1992.
14. Stuart, M., Box, K.: Anal. Chem. 77, 983-990 (2005)
15. Avdeef, A., Berger, C.M., Brownell, C.: Pharm. Res. 17, 85-89 (2000)
16. Avdeef, A.: Pharm Pharmacol. Commun. 4, 165-178 (1998)
17. Avdeef, A., Berger, C.: Eur. J. Pharm. Sci. 14, 281-291 (2001)
18. Kawakami, K., Miyoshi, K., Ida, Y.: Pharm Res. 22, 1537-1543 (2005)
19. Higuchi, T., Shih, F.-M., Kimura, T., Rytting, J.H.: J. Pharm. Sci. 68, 1267-1272 (1979).

Érkezett: 2011. február 15.

## Szemcseméret csökkentés jelentősége a preformulációban

SZUNYOGH TÍMEA, AMBRUS RITA, SZABÓNÉ RÉVÉSZ PIROSKA\*

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai Intézet, Szeged, Eötvös u. 6 – 6720

\*Levelezési cím: revesz@pharm.u-szeged.hu

### Summary

Szunyogh, T., Ambrus, R., Szabó-Révész, P.: **Importance of particle size decreasing in the preformulation**

Present work provides a short review concerning the importance of particle size decreasing in the drug formulation. The presented theoretical introduction collects the most important factors which influence the deintegration and integration mechanisms. Modification of particle size and morphology could overcome the formulation problems, resulted improved drug release. Wet milling and solvent diffusion, as a novel methods to complete with drying will be presented applying the poorly water-soluble niflumic acid. Differences in particle sizes were found according to the used processing. The specific surface area of the drug was increased following particle size reduction and the dissolution rate was therefore significantly improved. During structural characterizations (DSC and XRPD), strong interactions were detected between the drug and stabilizer.

**Keywords:** niflumic acid, particle size decreasing, wet milling, solvent diffusion.

### Összefoglaló

Jelen tanulmány rövid áttekintést nyújt a szemcseméret csökkentés jelentőségéről a gyógyszerformulálás területén. Az elméleti bevezető azokat a fontos tényezőket foglalja össze, amelyek befolyásolják a dezintegráló és az integráló mechanizmusokat. A részecskeméret és morfológia módosítása megoldást kínál a formulálási problémákra, kedvezően javíthatja a hatóanyag-felszabadulást. A gyenge vízzoldékonyságú nifluminsav esetében nedves őrlést, valamint oldószer diffúziós eljárást alkalmaztunk. A kapott szemcseméret az alkalmazott eljárások függvényében változott, a felületi szabadenergia és a polaritás a részecskeméret csökkenésének megfelelően növekedést mutatott, valamint az oldódási sebesség tekintetében is releváns javulást tapasztaltunk. A szerkezeti vizsgálatok (DSC, XRPD) szoros kapcsolatot mutattak a hatóanyag és az alkalmazott stabilizáló segédanyag között.

**Kulcsszavak:** nifluminsav, szemcseméret csökkentés, nedves őrlés, oldószer diffúzió.

### Bevezetés

Napjainkban az egyik legnagyobb kihívást a gyógyszertechnológus számára a rossz vízzoldékonyságú hatóanyagok preformulálása jelenti. A szemcseméret-eloszlás és az egyes szemcsék morfológiai sajátossága nagy befolyással bír a hatóanyagok fizikai-kémiai sajátosságaira, ezen kívül a részecskék habitusának (alak, méret, felület) meg kell felelnie egyes formulálási és felhasználási követelményeknek. A kisméretű kristályok előállításával javíthatjuk a biohasznosíthatóságot és/vagy a feldolgozhatóságot, valamint megfelelő geometriai paraméterek kialakításával lehetőség adódik alternatív gyógyszerbeviteli kapuk (nazális, pulmonáris) megcélzására is. A részecskék méretének újabb eljárások alkalmazásával való csökkentése megoldást kínál az oldékonysági és permeabilitási problémák kiküszöbölésére és így elősegítheti az originális és generikus gyógyszerek fejlesztését [1, 2]. A hatóanyag kioldódásának sebességét a Noyes-Whitney egyenlet definiálja. Az egyenlet szerint a kisebb részecskeméret a megnö-

vekedett fajlagos felület következtében nagyobb oldódási sebességet eredményez [3, 4]. Különösen fontos ez ott, ahol a hatóanyagok nagy permeabilitással ( $P_m > 10^{-6}$  cm/s), és gyenge vízzoldékonysággal ( $< 100$  µg/ml) rendelkeznek, vagyis a BCS (Biopharmaceutical Classification System) II. és IV. osztályába tartoznak [5, 6].

Jelen közlemény áttekintést nyújt a szemcseméret csökkentés elméleti vonatkozásairól, valamint gyakorlati példát mutat be egy rossz vízzoldékonyságú, nem szteroid gyulladáscsökkentő hatóanyag szemcseméret csökkentésén alapuló preformulálásáról.

### A szemcseméret csökkentés elméleti és gyakorlati alapjai

#### Dezintegráló műveletek

A szemcseméret csökkentésének egyik módja a dezintegráló művelet alkalmazása. A szilárd testeket önálló térfogat és alak jellemzi, ezen sajátosságok megváltozásával szemben ellenállást fejtenek ki. Tehát ha alak vagy térfogatváltozás elérése a

cél, akkor erőt kell kifejteni, azaz munkát kell végezni [7]. Az ún. *aprítási munkatörvények* a gépi aprítás munkaszükségletének az elért szemcsenagyságtól való függését fejezik ki. Az őrlendő anyag diszperzitásfoka és a berendezés aprításra fordított energiája közötti összefüggések megállapításával az ún. aprítási elméletek foglalkoznak. Az aprítás energiaszükségletén az adott fajlagos felületű, tömegegységnyi anyaghalmaz meghatározott nagyobb felületűvé változtatásához szükséges munkát értjük, kWh/t egységben kifejezve [8]. A gyakorlatban 3 fontos aprítási munkatörvényt alkalmazunk (Rittinger, Bond és Kick), amelyek közül a finom őrlés energia igényét a Rittinger elmélettel fejezzük ki [9-11]. *Rittinger* (1867) szerint a befektetendő energia mennyisége arányos az aprítási művelet során keletkező felületnövekedéssel [12]. Ezt a munkatörvényt „felületi” elméletnek is hívják.

Az őrlésre kerülő anyagok jellemzése szempontjából igen fontos azok mechanikai igénybevétellel szembeni ellenállása, vagyis *örölhetősége*. Ez a jellemző befolyásolja az alkalmazott eszköz kiválasztását és az őrlési folyamatok hatékonyságát. Az őrlhetőséget rendszerint az egységnyi tömegű vagy térfogatú anyag őrlésére fordított munkával

jellemzik, amelyet a megfelelő berendezésben, állandó körülmények között határozzák meg [13, 14].

Örölhetőség szempontjából nagyon fontos az anyagok *keményisége*, de nagyobb keménység nem jelent feltétlenül nagyobb őrlési energiaigényt. Az anyagok keménysége a Mohs-féle keménységi fokkal jellemezhető, ami azt adja meg, hogy egy anyag mennyire szilárd, mennyire ellenálló a külső, mechanikai hatásokkal szemben. Az 1-3 keménységi fokú anyagokat a puha anyagok közé (tal-  
kum, viasz), míg a 7-15 keménységi fokú anyagokat a kemény anyagok közé soroljuk (gyémánt) [15].

Az őrlés során a fellépő igénybevétel hatására megváltozhat:

- a szemcseméret,
- a fajlagos felület,
- a felületi energia,
- a repedések és hibák száma a szemcsékben,
- a kristályos állapot, továbbá
- a hőmérséklet, valamint
- kémiai változások történhetnek.

A folyékony halmazállapotú anyagok is dezintegrálódnak, azonban nem úgy szakadnak szét, mint a szilárd testek.

Az utóbbi években a *kavitáción* alapuló eljárások

#### I. táblázat

##### Különböző eljárások alkalmazásával elért szemcseméret

Alkalmazott eljárás	Hatóanyag	Alkalmazott segédanyagok	Részecskeméret	Irodalom
Sugármalom	Cilostazol	Hidroxipropil-cellulóz Dokuzát-Na	2,40 $\mu\text{m}$	[19]
Nedves őrlés	Nifedipin	Víz HPMC	15,70 $\mu\text{m}$	[20]
Nedves őrlés	Roxitromicin	Víz Laktóz HPMC Pluronic F-68	21,72 $\mu\text{m}$	[21]
Nedves őrlés	Naproxen	Víz Poloxamer 188	270 nm	[22]
Nagy intenzitású ultrahang	Gemfibrozil	Etil-acetát PVP (porlasztva szárítás)	2,89 $\mu\text{m}$	[23]
Nagy intenzitású ultrahang	Gemfibrozil	Etil-acetát PVP (fagyasztva szárítás)	21,28 $\mu\text{m}$	[23]
Nagy intenzitású ultrahang	Meloxicam	Benzil-alkohol Poloxamer-188 Trehalose	0,53 $\mu\text{m}$	[24]
Nagynyomású homogenizátor	Nifedipin	Víz HPMC	291 nm	[20]
Nagynyomású homogenizátor	Meloxicam	Etil-acetát Tween-80 Trehalose	46 nm	[24]

előretörése figyelhető meg a gyógyszer formulálás területén (nagynyomású homogenizálás, nagy intenzitású ultrahang). A kavitáció fizikai jelenség, amely akkor következik be, ha egy anyag folyadék fázisból hirtelen gáz fázisba megy át a nyomás esése következtében. Ha a folyadék áramlási sebessége hirtelen megnő, akkor az energia-megmaradás törvénye értelmében (Bernoulli törvénye) a nyomása leesik. Ha egy nagy nyomású folyadékban hirtelen nyomáscsökkenés következik be, a folyadék gyakorlatilag szétszakad. Belső folytonossága megszűnik, hézagok, rések keletkeznek benne a pillanatnyi mozgási viszonyoknak megfelelően. A buborékok mérete és száma, valamint térbeli sűrűsége a nyomáscsökkenés mértékétől függ. Így akár folyadékok cseppméretét vagy szuszpendált hatóanyag szemcseméretének csökkentésére is lehetőség adódik [16].

### Integráló műveletek

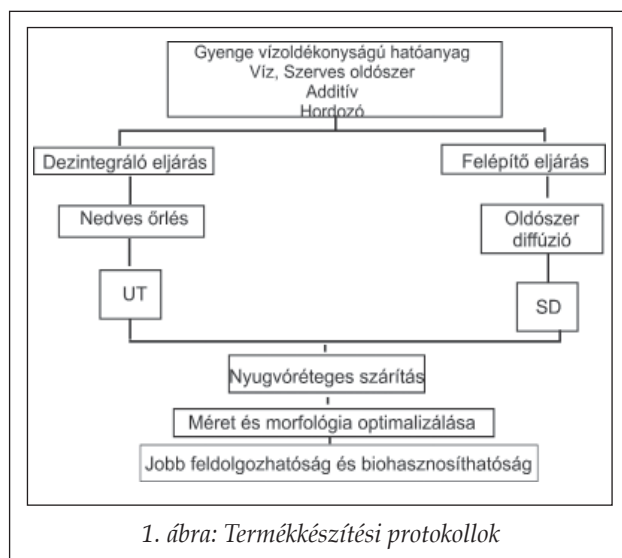
A szemcseméret csökkentés ezen módja a molekulárisan diszpergált hatóanyagból kiindulva szemcsék képzése szabályozott integrációs művelettel. Ebben az esetben molekuláris szintről (hatóanyag oldata) kiindulva kristályokat építünk fel, szabályozva a méretet és a morfológiát. Az integráló művelet esetén is szükség van a dezintegráló műveletre a méret kontrollálása céljából, ezért a két művelet ilyen szempontból nem különíthető el élesen egymástól. Az energiaközlés módja más és más lehet (nagy intenzitású ultrahang, ultraturrax, nagynyomású homogenizátor) úgy, mint az oldószer eltávolításának lehetőségei (líofilezés, porlasztva szárítás, vákuumszáritás). Ezek alapján a főbb technikák közé az SCF (szuperkritikus folyadéktechnológia), az EPAS (vizes oldatba történő párolgáson alapuló precipitáció) és az oldószer/emulzió diffúzió, valamint az olvadék-emulgeálás módszerei tartoznak [17, 18].

Az **I. táblázatban** a különböző eljárások alkalmazásával elérhető szemcseméreteket szemléltetjük irodalmi adatok alapján.

### Kísérletes rész

#### Anyagok

Felhasznált anyagok: *nifluminsav* (NIF): Richter G. Gyógyszergyár (Budapest, Magyarország);  $\beta$ -*D*-mannit: Hungaropharma (Budapest, Magyarország); *Poloxamer 188* (polietilén-polipropilén glikol): Fluka, (Ljubljana, Szlovénia).



### Termék előállítási módszerek

Az **1. ábrán** látható protokoll foglalja össze a termékkészítés főbb lépéseit. Az összetételekben a hordozó (mannit) mellett, Poloxamert használtunk additívként. A mannit mint vivőanyag, biztosítja a NIF egyenletes eloszlását a rendszerben, a Poloxamer pedig stabilizálóként, a nedvesedést segíti elő, ezzel a hatóanyag aggregációját gátolja. A dezintegráló eljárás során vizes közegben nedves őrlést alkalmaztunk, az oldószeres eljárás során pedig egy vízzel részben elegyedő oldószert, az etil-acetátot választottuk az oldószer diffúzió kivitelezése céljából. Mindkét módszernél 50 °C-on nyugvóréteges szárítást alkalmaztunk (MEMMERT GmbH and Co. KG Németország).

### Előállítás dezintegráló művelettel

A stabilizálót és a hordozót is tartalmazó NIF vizes szuszpenziójával nedves őrlést végeztünk ultraturrax-szal (Janke & Kunkel, IKA Labor-technik, Németország) 9000 majd 24000 fordulat/számon 30 percig (UT). A hatóanyag (NIF), a hordozó (mannit) és a stabilizáló (Poloxamer) segédanyag 1:1:0,1 arányban került felhasználásra. Referenciaként elkészült a komponensek fizikai keveréke (ható-, illetve segédanyagok a hasonló tömegarányokkal) is Turbula keverővel (Willy A. Bachofen Maschinenfabrik Basel, Svájc) (50-es fordulatszám, 10 perc) (REF-UT) (**II. táblázat**).

### Előállítás precipitáció alkalmazásával

A precipitáció módszerénél a NIF szerves oldószerben mutatott oldékonysága (59,3 mg/ml) volt a



Termékek összetétele

	NIF	Mannit	Poloxamer	Oldószer
UT	2,5	2,5	0,25	Desztillált víz
REF-UT	2,5	2,5	0,25	-
SD	1	2,5	0,25	Etil acetát / víz
REF-SD	1	2,5	0,25	-

meghatározó tényező, ezért a hatóanyag mennyiségét csökkenteni kellett az UT mintákhoz képest. Az additív (Poloxamer) és a hordozó (mannit) változatlan mennyiségben került felhasználásra, a dezintegráló művelethez képest. A NIF mennyiségét viszont 0,4 részre kellett csökkenteni a már említett nem kielégítő oldékonyság miatt (0,4:1:0,1 arány). Tehát elkészítettük a nifluminsav etil-acetátos oldatát, amelyet ultraturrax-ozás közben 1 mp-ként adagoltuk a hordozót és additívet tartalmazó vizes oldathoz, így „kvázi” mikroemulziót képeztünk. Számított mennyiségű víz (35 ml) hozzáadásával elértük az etil-acetát-víz elegyedéséhez szükséges koncentrációt és a hatóanyag kiválását (SD = solvent diffusion).

Hasonlóképpen a tömegarányok azonosságával itt is elkészült Turbula keverő alkalmazásával a ható- és segédanyagokat tartalmazó fizikai keverék (REF-SD) (II. táblázat).

#### Vizsgálati módszerek

##### Szemcseméret megoszlás

A termékekben levő NIF szemcsék méretét és méreteloszlását Malvern Mastersizer 2000 készülékkel (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) határoztuk meg (Hydro 2000 SM kis térfogatú diszpergáló egység). 10 perc ultrahangozást követően a segédanyagok oldódtak, így csak a NIF kristályok méretét detektáltuk.

##### Szerkezeti jellemzők

A termékek termoanalitikai viselkedését Mettler Toledo STAR® termoanalitikai készülékkel (Mettler Inc., Schwerzenbach, Svájc) határoztuk meg. A DSC (differenciál pásztázó kalorimetria) és TG (termogravimetria) méréseket argon gáz átáramoltatásával (10 l/óra) végeztük (2–5 mg-os minta, 25–300 °C, 5 °C/perc fűtési sebesség).

A hatóanyag kristályos jellegét porröntgen diffraktométerrel határoztuk meg (Miniflex II Rigaku por-röntgen diffraktométer, Rigaku Co. Tokyo, Japan). Mérési paraméterek: Cu ( $K\alpha$  = 1,5405 Å), 30 kV, 15 mA.

##### Fizikai-kémiai sajátságok

Az oldékonysági vizsgálatot desztillált vízben végeztük el, szobahőmérsékleten. 24 órás keverést követően mintát véve, szűrés és hígítás után spektrofotométerrel (ATI UNICAM UV-VIS spektrofotométer) a kapott abszorbanciák alapján határoztuk meg a feloldódott hatóanyagtartalmat 288 nm-en.

A nedvesedési peremszög, felületi szabadenergia ( $\gamma$ ) illetve a polaritás meghatározásához 0,15 g terméket Perkin Elmer hidraulikus préssel 1 tonna erővel préseltük pasztillává, majd felszínükre poláros, illetve apoláros oldószert cseppentettünk. A nedvesedési peremszög változása 1-30 másodpercig került detektálásra Dataphysics OCA 20 készülékkel (Dataphysics Inc. GmbH, Németország), majd a Wu összefüggés [25] alkalmazásával, a vizsgált minták felületi szabadenergiát ( $\gamma$ ) a poláros és apoláros komponens felületi szabadenergiájának összegéből kalkuláltuk. A vizsgálatok során használt oldószerek, a desztillált víz ( $\gamma^p$  = 50,2 mN/m,  $\gamma^d$  = 22,6 mN/m) és a dijódmétán ( $\gamma^p$  = 1,8 mN/m,  $\gamma^d$  = 49 mN/m) voltak. A polaritás kiszámítása a  $\gamma^p$  és a  $\gamma$  értékekből a  $(\gamma^p/\gamma)*100$  képlet segítségével történt [26].

A termékek kioldódását a Magyar Gyógyszerkönyvben is hivatalos forgólapátos kioldókészülékkel határoztuk meg. 28 mg NIF-at (terápiás dózisának megfelelő érték) tartalmazó terméket a 100 ml 37 °C-os gyomornedvbe, illetve bélmedvebe helyeztünk, mert bár a NIF nagy része bélből szívódik fel, kismértékű felszívódás gyomorból is tapasztalható (fordulatszám 100/perc). A mintavételt követően, megfelelő hígítás után, a hatóanyag kioldódását spektrofotométerrel detektáltuk.

#### Eredmények értékelése

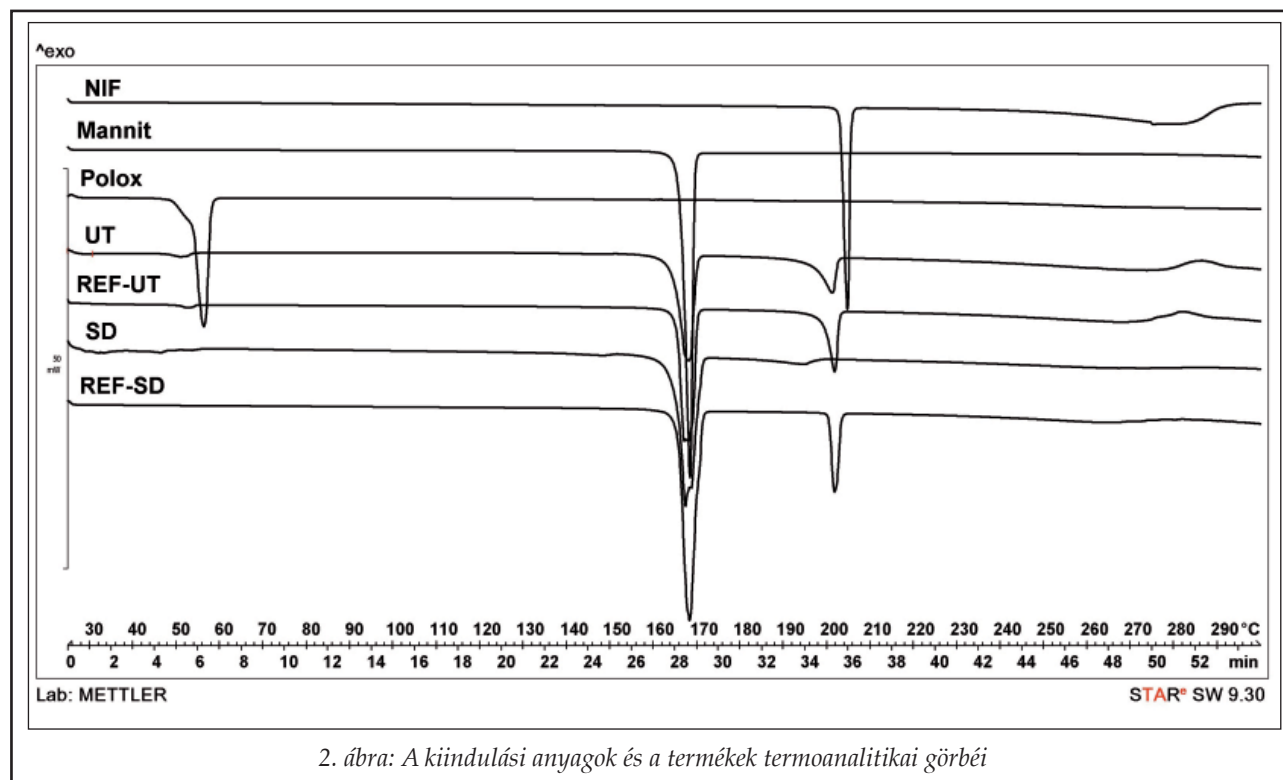
##### Szemcseméret megoszlás

Ahogy a III. táblázat mutatja, a hatóanyag relatíve nagy, 80,41  $\mu\text{m}$ -es kristályokból tevődik össze. A dezintegráló művelet (UT) alkalmazásával a NIF szemcsemérete harmadára csökkent, azonban az oldószer diffúzió módszere (SD) 90%-ban 16

III. táblázat

A kiindulási és a termékekben található hatóanyag szemcseméret megoszlása

Termékek	D (V; 0,1) ( $\mu\text{m}$ )	D (V; 0,5) ( $\mu\text{m}$ )	D (V; 0,9) ( $\mu\text{m}$ )	Fajlagos felület ( $\text{m}^2\text{g}^{-1}$ )
NIF	26,40	80,41	223,37	0,142
UT	9,04	30,20	69,65	0,314
SD	2,56	5,95	16,10	1,175



2. ábra: A kiindulási anyagok és a termékek termoanalitikai görbéi

$\mu\text{m}$  alatti hatóanyagot eredményezett, s a D (V; 0,5), 5,95  $\mu\text{m}$ -es hatóanyag részecskék jelenlétét mutatta. A csökkentett méret nagyobb fajlagos felületet eredményezett, amely 2-8 szorosára nőtt a NIF kiindulási szemcseméretéhez viszonyítva.

#### Szerkezeti jellemzők

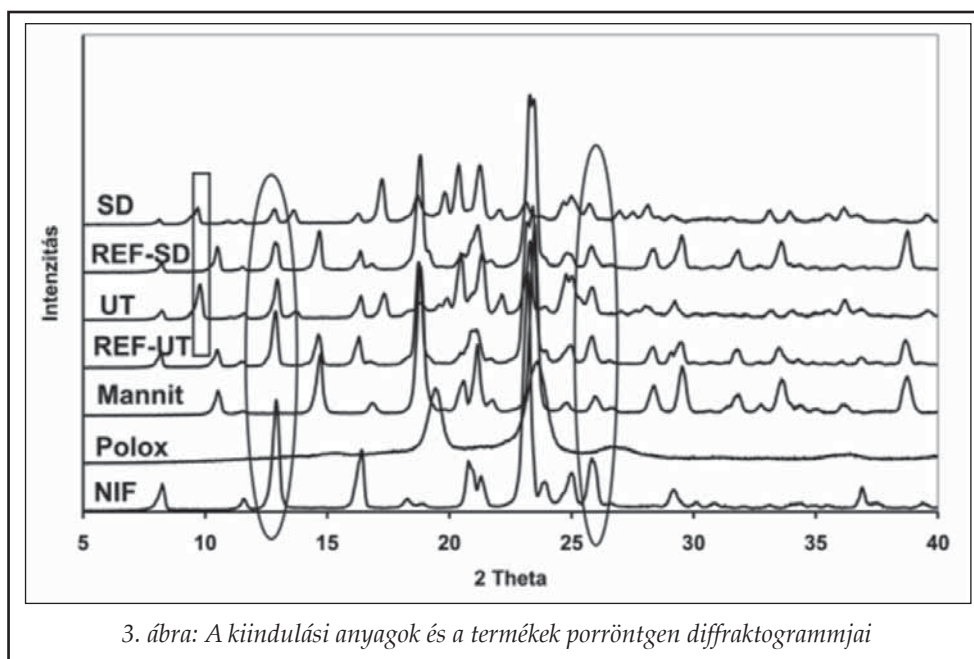
A hatóanyagok és a segédanyagok termoanalitikai viselkedését DSC módszerrel vizsgáltuk. A 2. ábrán látható éles endoterm csúcsok a Poloxamer (55,8 °C), a mannit (166,4 °C) és a NIF (203,54 °C)

olvadáspontját mutatják. A termékekben a Poloxamer endoterm csúcsára jellemző terület minimálisra csökkent, ami a hatóanyag-segédanyag arányával hozható összefüggésbe. A termékek tekintetében a NIF olvadáspontja, valamint kristályossági foka kismértékben csökkent, aminek magyarázata az, hogy a NIF egy része a 166 °C-on megolvadt mannit olvadékába beoldódik. Azonban kivételt képez az oldószer diffúzióval előállított minta, ahol a hatóanyag szerkezetében markáns változások jelentkeztek, ami olyan szilárd

IV. táblázat

A NIF és a mannit kristályossági indexe

Termékek	$\Delta H_{\text{NIF}}$ ( $\text{Jg}^{-1}$ )	$\text{CI}_{\text{NIF}}$ (%)	$\Delta H_{\text{Mannit}}$ ( $\text{Jg}^{-1}$ )	$\text{CI}_{\text{Mannit}}$ (%)
UT	42,27	89,2	127,88	86,8
REF-UT	47,38	100	147,26	100
SD	7,32	15,7	182,21	82,0
REF-SD	46,52	100	222,18	100



diszperzió keletkezését jelenti, amelyikben a NIF nagy része amorf formában található. Előkísérlettel igazoltuk, hogy a NIF etil-acetátból történő ki-kristályosítása önmagában nem vezet amorfizáláshoz. A TG mérések azt igazolták, hogy az oldószer diffúzióval előállított termékekben szerves oldószer maradvány nem található.

A termékek görbéiből kapott normalizált integrálokból az anyagok kristályossági indexét határoztuk meg. A kontroll termékekben levő NIF kristályosságát 100%-nak véve az UT-ben jelen levő NIF és a mannit kristályossága kismértékben csökkent. Az SD termék esetében a NIF kristályossága 15,7%-ra csökkent, ami azt jelenti, hogy a maradék valószínűleg amorf formában van jelen a rendszerben (IV. táblázat).

A porröntgen felvételek alapján (3. ábra) elmondható, hogy a hatóanyag karakterisztikus intenzitás értékei a termékekben is megtalálhatóak. A minták porröntgen felvétele a következő fő információkat hordozza: a hatóanyag kristályossága jelentősen csökkent az SD termék esetében, azonban a karak-

terisztikus csúcsok 13 és 26  $2\theta$  értékeknél megtalálhatóak. A mannit sajátosságaira jellemző csúcsok a következő  $2\theta$  értékeknél jelennek meg: 10,56; 14,82; 16,94; 20,6; 29,6. Azt tapasztaltuk, hogy a kiindulási  $\beta$ -D-mannit szerves oldószeres átkristályosítása alfa és delta módosulatok megjelenését eredményezte 9,8  $2\theta$  értéknél.

#### Fizikai-kémiai sajátosságok

Az oldékonysági vizsgálatok azt mutatták, hogy a NIF rossz vízoldé-

konysága (0,0389 mg/ml), az SD termék esetén 3x-ra növelhető (0,1003 mg/ml), ami a mikroméret-tartomány elérésének köszönhető. A referencia termékek esetén megállapítható kismértékű oldékonyság növekedés a segédanyagok szerepének tulajdonítható, ám számottevő változást ebben az esetben nem tapasztaltunk (V. táblázat).

A hatóanyag nedvesedése és polaritása annak lipofil jellegére utal, míg a minták ezzel szemben hidrofil sajátyságot mutatnak. A V. táblázatban látható, hogy a kontrollként készült termékek önmagukban is jelentős változást eredményeztek a hidrofilitásban, ami nagyrészt a nedvesedést fokozó segédanyag alkalmazásának köszönhető. Az UT és az SD termékek 20-26 °-os peremszöge illetve 42-43%-os polaritása előrevetíti, hogy nedvesedésük és kioldódásuk is jobb lesz a hatóanyaghoz képest.

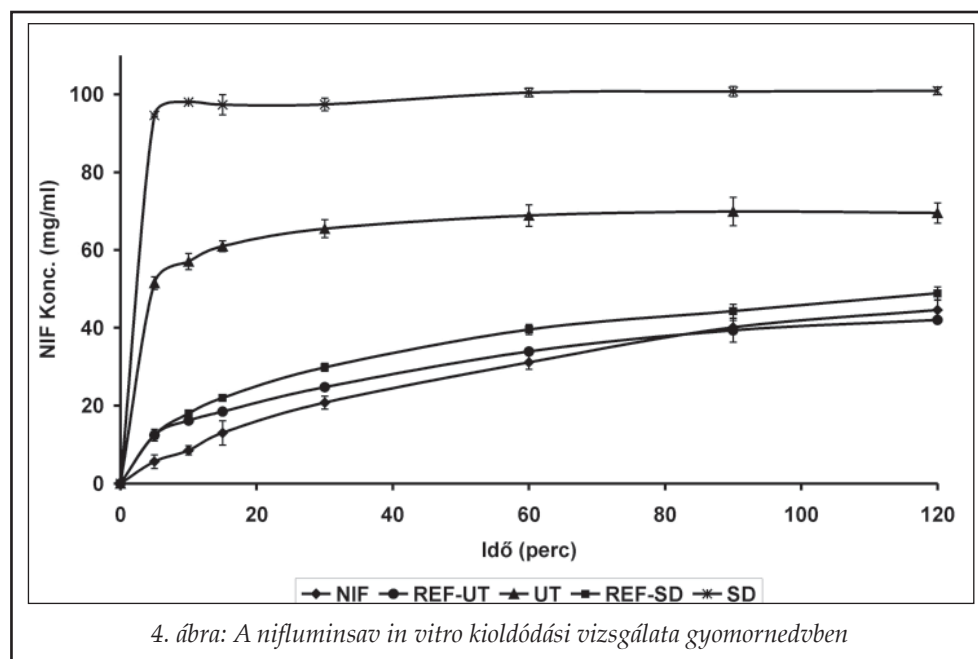
A munka folytatásaként elvégeztük az *in vitro* kioldódási vizsgálatokat. Látható, hogy a NIF kioldódása mesterséges gyomornedvben (4. ábra) önmagában rosszabb eredményeket mutat, mint bél-

V. táblázat

A kiindulási hatóanyag és a termékek fizikai sajátosságainak jellemzése

Termékek	Oldékonyság vízben (mg/ml)	$\Theta_{\text{viz}}^{\circ}$ [°]	$\Theta_{\text{diódmétán}}^{\circ}$ [°]	$\gamma$ [mN m <sup>-1</sup> ]	Polaritás [%]
NIF	0,0389	72,50 ± 1,73	31,38 ± 2,49	51,11	21,91
UT	0,0460	26,90 ± 4,68	17,31 ± 3,29	75,73	42,18
REF-UT	0,0565	36,45 ± 10,64	30,12 ± 7,92	53,53	42,16
SD	0,1003	20,50 ± 0,14	17,56 ± 1,40	77,92	43,92
REF-SD	0,0536	22,10 ± 6,08	30,70 ± 7,64	74,77	46,99





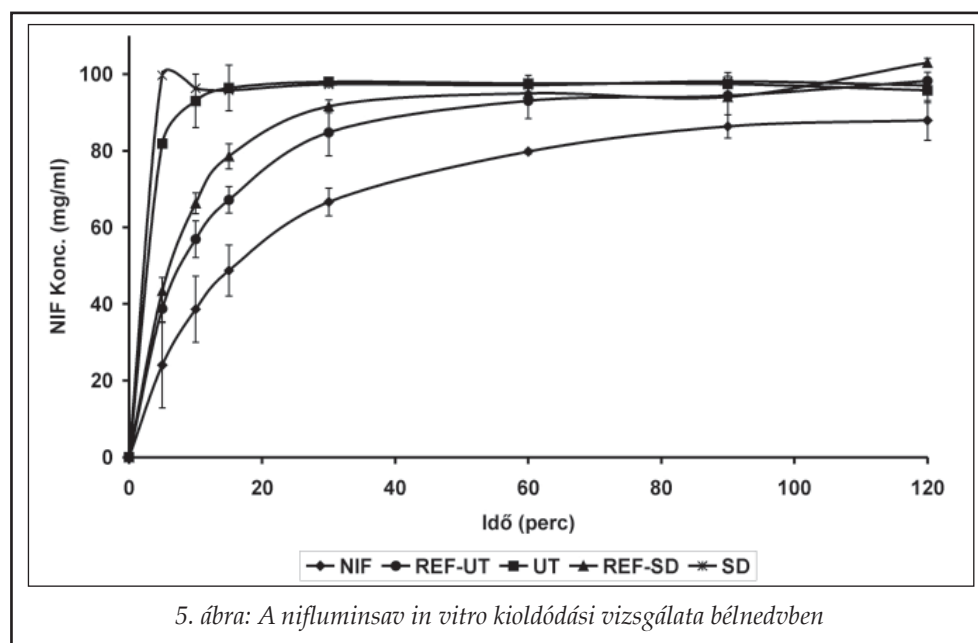
oldódást tapasztaltunk a tiszta NIF-hez és a kontrollhoz viszonyítva. Mindkét közegben az első 10 percben pillanatszerű 90-100% kioldódást kaptunk. A bélnedvben történő vizsgálatnál jellemző a „burst-effektus”, ami hirtelen, pillanatszerű, kioldódást jelent. Elmondható tehát, hogy a csökkentett szemcseméret és az amorf sajátosságot mutató SD minta gyors és tökéletes (100% NIF) kioldódást eredményezett.

### Összegzés, jövőkép

Munkánk során az ipar számára is egyszerűen kivitelezhető preformulációs vizsgálatokat mutattunk be, gyenge vízoldékonyságú modell hatóanyag feldolgozhatóságának és/vagy biohasznosíthatóságának javítása céljából. A gyógyszer technológia területén a nedves őrlés a hagyományos eljárások közé tartozik. Az eljárásen belül különböző módszerek alkalmazhatóak a hatóanyag kristályok

preformulációs eljárásokkal a gyomorból történő felszívódás is javítható. Megállapítható, hogy a kioldódást önmagában a Poloxamer és a mannit jelenléte jelentősen nem befolyásolta gyomornedvben, azonban bélnedvben elértük a referencia termékek esetén is, hogy az első 30 percen a hatóanyag 80%-a felszabaduljon (REF-UT és REF-SD). Az UT termékből mind gyomor-, mind bélnedvben az első 10 percen a hatóanyag 60, illetve 80%-a kioldódott, tehát megállapítható az oldódási sebesség növekedése a NIF-hez, valamint a referencia termékekhez képest. Az oldószer diffúzióval előállított minta (SD) esetén szignifikánsan jobb ki-

habitusának, szerkezetének, oldékonyságának és permeabilitásának befolyásolása céljából. Az eljárások, az oldószer, illetve az additív változtatásával a hatóanyag fizikai-kémiai sajátosságai kedvezően befolyásolhatóak. Azt tapasztaltuk, hogy a csökkentett részecskeméret, kedvező nedvesedést és polaritást, valamint gyors hatóanyagkioldódást biztosított. Eredményeink azt mutatták, hogy különböző eljárások alkalmazásával a hatóanyag habitusában és szerkezetében jelentős változások keletkeztek, köszönhetően a szemcseméret csökkentésnek, illetve szilárd diszperzió keletkezésének, ami tökéletes (100%) kioldódást eredményezett.



### Köszönetnyilvánítás

Ez a munka az Új Magyarország Fejlesztési Terv támogatásával valósult meg: Keringési, anyagcse-re és gyulladásos betegségek teranosztikájának fejlesztése (TÁMOP-4.2.2-08/1-2008-0013).

### IRODALOM

1. Leuner, C., Dressmann, J.: Eur. J. Pharm. Biopharm. 54, 107-112 (2002).
2. Antal, I.: Acta Pharm. Hung. 76, 95-103 (2006).
3. Noyes, A., A., Whitney, W., R.: J. Amer. Chem. Soc. 19, 930-934 (1897).
4. Antal, I.: Acta Pharm. Hung., 71, 280-288 (2001).
5. Ujhelyi, G., Venczel, M., Bajdik, J., Kónya, M., Vajdai, A.: Magyar Kémikusok Lapja 9, 287-289 (2010).
6. Antal, I., Zelkó, R., : Acta. Pharma. Hung. 78, 121-133 (2008).
7. Fejes G., Tarján, G.: Vegyipari gépek és műveletek. Tankönyvkiadó, Budapest, 1979. 61-71. old.
8. Szabóné Révész, P.: Gyógyszertechnológia. Egyetemi jegyzet, JatePress, Szeged, 2009. 155-161.old.
9. Kick, F.: Dinglers J. 250, 141 (1883).
10. Bond, F.C.: Mining Eng. 193, 484-494 (1952).
11. Beke, B.: A finomörlés folyamata Budapest, 1975. 65-82.old.
12. Rittinger, P., Ritter von: Lehrbuch der Aufbereitungskunde, Berlin Verlag Ernst und Korn, (1867).
13. Rácz, I., Selmeczi, B.: Gyógyszertechnológia 2. kötet. Medicina Kiadó, Budapest, 2001. 13-28. old.
14. Fogarasi, L.: Mechanical properties of cereal grains of different biological factors (Különböző biológiai állapotú gabonamagvak mechanikai jellemzői) GATE-Lengyel Tudományos Akadémia Agrofizikai Kutatóintézete, Közös Tanácskozás, Gödöllő (1989).
15. Mohs, F.: Grundriss der Mineralogie 1824 (English translation by Haidinger W. Treatise on Mineralogy constable, Edinburgh 1825).
16. Parag, R., Gogate, Rajiv, K., Tayal, Aniruddha, B., Pandit: Curr. Sci. 91, 35-46 (2006).
17. Hu, J. et al.: Drug Dev. Ind. Pharm. 30, 233-245 (2004).
18. Kocbek, P., Baumgartner, S., Kristl, J.: Int. J. Pharm. 312, 179-186 (2006).
19. Jun-ichi, J., Naoki, K., Masateru, M., Keigo, Y., Tadashi, M., Masaaki, O., Hajime, T., Liversidge, G., G., Kazutaka, H., Toshikuro, K.: J. Control. Release 111, 56-64 (2006).
20. Hecq, J., Deleers, M., Fanara, D., Vranckx, H., Amighi, K.: Int. J. Pharm. 299, 167-177 (2005).
21. Biradar, S.V., Patil, A.R., Sudarsan, G., Pokharkar, V.B.: Powder technol. 169, 22-32 (2006).
22. Liversidge, G., G., Conzentino, P.: Int. J. Pharm. 125, 309-313 (1995).
23. Ambrus, R., Amirzadi, N., N., Sipos, P., Szabóné, Révész, P.: Chem. Eng. Technol. 33, 827-832 (2010).
24. Ambrus, R., Kocbek, P., Kristl, J., Sibanca, R., Rajkóc, R., Szabóné Révész, P.: Int. J. Pharm. 381, 153-159 (2009).
25. Wu, S.: J. Polym. Sci. 34, 19-30 (1971).
26. Oh, E., Luner, P., E.: Int. J. Pharm. 188, 203-219 (1999).

Érkezett: 2011. március 10.

## Amorf forma a gyógyszer technológiai kutatásokban

MÁRTHA CSABA, JÓJÁRTNÉ LACZKOVICH ORSOLYA, SZABÓNÉ RÉVÉSZ PIROSKA\*

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszer technológiai Intézet, Szeged, Eötvös u. 6. – 6720

\*Levelezési cím: revesz@pharm.u-szeged.hu

### Summary

Mártha, Cs., Jójárt-Laczovich, O., Szabó-Révész, P.: *Amorphous form in pharmaceutical technological research*

Detecting and analysing of the amorphous phase are increasingly important in pharmaceutical technology. The amorphous or glassy state has a several advantages and disadvantages. The amorphous form can be applied in deliberate amorphization, when active pharmaceutical ingredient (API) is formulated in glassy state, or this form can appear accidentally during formulation or storage. The aim of this study was to characterize glass-forming properties of 13 different materials. Differential Scanning Calorimetry (DSC) was used as an analytical technique and  $T_g$  and  $T_m$  values were determined. The equation of  $T_g/T_m$  (K/K) was applied to determine the glass-forming tendencies. We made 2 groups of investigated substances. The first group was that we could not amorphize: tenoxicam, mannitol, niflumic acid, theophyllin and lidocaine. The second group contains materials, which could be prepared in glassy form. This group can be divided into 2 sub-groups: poor-glass formers and good-glass formers. Poor-glass formers are following: meloxicam, ibuprofen and piroxicam. Good-glass formers are lacidipine, gemfibrosil, sorbitol, loratadine, chlorhexidine and clopidogrel hydrogensulfate.

**Keywords:** amorphous, amorphization, accidentally amorphization, glass transition, DSC.

### Összefoglalás

Az amorf forma kimutatása, vizsgálata és a különböző anyagok amorfizálhatósági tulajdonságainak meghatározása egyre inkább előtérbe kerül a gyógyszer technológiában. Az amorf fázis számos előnyös és hátrányos tulajdonsággal rendelkezik a kristályos fázishoz képest. Előnyös tulajdonságai miatt amorfizálhatjuk közvetlenül a hatóanyagokat, vagy keletkezhet véletlenszerűen is különböző behatások miatt. Munkánk során 13 ható- illetve segédanyag amorfizálhatóságát vizsgáltuk egy termoanalitikai gyorseszttel, amelyhez DSC készüléket használtunk. Meghatároztuk az egyes anyagok olvadáspontját ( $T_m$ ) és üvegesedési hőmérsékletét ( $T_g$ ). A  $T_g/T_m$  (K/K) arány segítségével meghatároztuk az anyagok amorfizálhatóságát. A kapott eredmények alapján két csoportba soroltuk az anyagokat: az első csoport anyagait nem tudtuk amorfizálni. Ezek voltak: a tenoxikám, a mannit, a nifluminsav, a teofillin és a lidokain. A második csoport anyagait üveges állapotba tudtuk vinni. Ezt a csoportot két alcsoportra osztottuk: az első alcsoportba a rosszul amorfizálható anyagok tartoznak, amelyek a következők: ibuprofén, meloxikám és piroxikám. A második alcsoport anyagai jól amorfizálhatóak. Ezek a következők: lacidipin, gemfibrozil, szorbit, loratadin, klórhexidin, és a klopidozrel hidrogén-szulfát.

**Kulcsszavak:** amorf, amorfizálás, véletlenszerű amorfizálás, üvegesedési hőmérséklet, DSC.

### Bevezetés

Az amorf fázis, a szilárd fázis egyik alfázisa a kristályos alfázis mellett [1]. Az amorf kifejezés alakatlan, formátlan, rendezetlen állapotot jelent. Ez utal arra, hogy egy amorf anyag kristályrácsában csak rövid távú rendezettség alakul ki. Az ipar számos területén alkalmaznak különböző amorf anyagokat: az üveggyártásban, ahol a szilícium-dioxid, mint kis molekulájú szervesetlen anyag kerül felhasználásra, a műanyagiparban, ahol makromolekulás szerves anyagokat használnak, például a polietilént, illetve a gyógyszer gyártásban, ahol főleg kis molekulatömegű szerves anyagokat formulálnak.

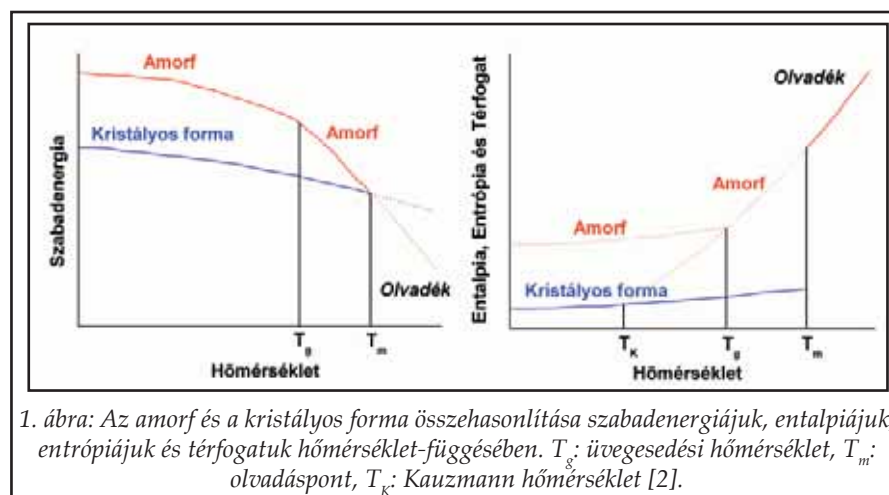
### Célkitűzés

Munkánk során célunk volt áttekintést adni az

amorf formáról gyógyszer-technológiai szempontból, illetve kristályos anyagok amorfizálódását vizsgálni, egy egyszerűen és gyorsan elvégezhető gyorseszt segítségével, amely alkalmas az amorf forma keletkezését szimulálni. Meghatároztuk az anyagok olvadáspontját ( $T_m$ ), üvegesedési hőmérsékletét ( $T_g$ ), valamint a kettő arányából következtetést vontunk le azok amorfizálhatóságra. További célunk volt annak az ellenőrzése, hogy az irodalmi közlésnek megfelelően a  $T_g$  valóban a  $T_m$  2/3-a illetve 4/5-e közé várható-e [1].

### Az amorf forma jellemzése

Az amorf (üveges) forma jelenléte és vizsgálata a gyógyszeriparban fokozott, hiszen az amorf fázis viselkedése merőben eltér a kristályos anyagétól, tulajdonságai lehetnek hátrányosak, de előnyösek is. Az amorf anyag szabadenergiája, entalpiája,



1. ábra: Az amorf és a kristályos forma összehasonlítása szabadenergiájuk, entalpiájuk és térfogatuk hőmérséklet-függésében.  $T_g$ : üvegesedési hőmérséklet,  $T_m$ : olvadáspont,  $T_c$ : Kauzmann hőmérséklet [2].

entrópiája és térfogata is nagyobb, mint a kristályosé. A hőmérséklet emelésével viszont szabadenergiája csökken, entalpiája, entrópiája és térfogata növekszik (1. ábra). Az amorf anyag általában higroszkóposabb és nagyobb oldódási sebességgel rendelkezik, mint a kristályos, hiszen nem rendelkezik szabályos kristályráccsal, így rácsenergiával sem, amely az oldódás termodinamikai gátja. Az anyag üveges állapotában nem rendelkezik olvadásponttal ( $T_m$ ), viszont jellemző rá az ún. üvegesedési hőmérséklet ( $T_g$ ). Az amorf fázisra jellemző érték továbbá a Kauzmann hőmérséklet ( $T_c$ ), amelyen az amorf és a kristályos anyag entrópiája megegyezik. E hőmérséklet alatt az amorf anyag stabilabbnak tekinthető a kristályosnál (Kauzmann paradox) [2].

A  $T_g$  alatt az anyag rideg, törékeny, nehezen alakítható, majd a hőmérséklet emelése és a  $T_g$  átlépését követően fokozatosan lágyul, és válik rugalmas-sá. Ezért fontos tudni, hogy adott anyag  $T_g$  értéke szobahőmérséklet alatt vagy felett található-e. Tapasztalatok szerint a  $T_g$  az olvadáspont 2/3-a, 4/5-e között várható Kelvinben számolva. A  $T_g$  és  $T_m$  arányából következtethetünk az adott anyag amorfizálhatósági tulajdonságaira: ha a  $T_g/T_m$  aránya nagyobb, mint 0,7 akkor az anyag jól amorfizálható. Ha ez az arány kisebb, akkor a kristályos szerkezet letörése után a rendezetlen (amorf) forma szinte azonnal visszakristályosodik, tehát az anyag rosszul amorfizálható [3]. A hatóanyagok általában kis molekulájú szerves anyagok, amelyek a magas szerkezeti flexibilitásuk miatt, sok esetben sorolhatóak a jól amorfizálható csoportba.

### Az amorf forma keletkezése

A gyógyszer technológiai műveletek során két esetben számolhatunk az amorf forma jelenlétével: a

formulálandó kristályos anyagot közvetlenül amorf állapothoz hozzuk. Ebben az esetben amorf hatóanyag áll rendelkezésre a gyógyszerforma kialakításához. A másik esetben viszont a hatóanyag valamely gyártásközi művelet, esetleg a tárolás során, részben vagy akár egészében véletlenszerűen amorfizálódik.

A kristályos anyag amorfizálására hagyományosan három különböző eljárást alkalmazunk:

- *Oldószeres eljárás*, amely során feloldjuk az anyagot annak jó oldószerében, majd gyorsan eltávolítjuk azt, így a molekuláknak nincs elég idejük, hogy szabályos kristályrácsba rendeződjene, tehát mindez rendezetlen, amorf formát eredményez [4]. Az oldószer eltávolítása történhet hőmérsékletemeléssel, nyomáscsökkentéssel, porlasztással [5], fagyasztva szárítással [6], vagy szuperkritikus technológiával [7].
- *Olvadék technológia (Hot-melt technology)*: amelynek egyik módja, hogy az anyagot az olvadáspontja felé hevítjük, majd hirtelen visszahűtjük [8], vagy egy megfelelő segédanyagot olvasztunk meg, és az olvadékban diszpergáljuk a hatóanyagot.
- *Örléssel*, amelynek során a hatóanyagot magában, vagy segédanyaggal őrlhetjük különböző malmokban szobahőmérsékleten, vagy akár hűtve [9]. Az őrlés során fellépő mechanikai erők, a nyomás és a súrlódás miatt keletkező hő okozta helyi olvadások amorfizálhatják az anyagot.

Az amorf forma véletlenszerű keletkezését számos technológiai folyamat eredményezheti. Az *oldószer eltávolítás* számos technológiai folyamat része és sok esetben eredményezhet amorf terméket. A napjainkban egyre gyakrabban alkalmazott *olvadék technológiák* is képesek az anyagot amorfizálni. Az olvadás során felbomlott kristályrács egyes esetekben nem nyeri vissza a rendezettségét a hűtést követően, amely így amorf formát eredményez [9]. Ugyancsak amorf terméket kaphatunk, ha egy segédanyagot, pl. PEG megolvasztunk, és az olvadékban a hatóanyag feloldódik [10]. Gyakran amorfizálódik a termék szemcseméret csökkentés közben is. Örlési eljárás során golyósmalomban vagy hengermalomban végzett rövid ideig tartó őrlés is képes lehet részben, vagy egés-



szében amorf formát létrehozni [11–13], de olyan eszközök, amelyek kisebb szemcseméret elérésére alkalmasak, mint például a nagy nyomású homogenizátor [14] vagy a kolloid malom [15], nagyobb valószínűséggel amorfizálják a terméket. Leggyakrabban a préseléses eljárások, a tablettázás és száraz granulálás (brikettezés, kompaktálás), okoznak problémát: a művelet alatt fellépő nagy nyomás, és a súrlódás miatti hő okozta helyi olvadások amorfizálhatják a ható- vagy segédanyagokat [16].

### Az amorf forma vizsgálata

Az előzőekből következik, hogy számos esetben szükség lehet olyan vizsgálatokra, amelyekkel igazolható a hatóanyag kristályos voltának teljes, vagy részleges hiánya, és a megjelenő amorf fázis kvantitatív meghatározása. Az amorf fázis detektálása, és további vizsgálata szerkezetéből adódóan számos problémát vet fel:

1. Mivel termodinamikailag instabil rendszerek, mindig számolnunk kell visszakristályosodással a vizsgálat egésze során. Már a minta vétele során alkalmazott fizikai behatás, az eltérő hőmérséklet, páratartalom vagy nyomás is okozhat olyan változást, ami hamis eredményt adhat.
2. Sok esetben a terméknek csak egy része amorf, és a maradék kristályos rész sem feltétlenül csak egyféle polimorf módosulatot tartalmaz. Előfordulhat még, hogy a termékben az előállítás során keletkezett instabil amorf rész elbomlása során keletkező bomlástermék is kimutatható.
3. Problémás lehet még a termékben lévő különböző komponensek egymás mellett történő kimutatása.

Az amorf fázis kimutatására leggyakrabban a differenciális pásztázó kalorimetriát (DSC) alkalmazzák. A készülék entalpiaváltozást detektál a hőmérséklet függvényében. A  $T_m$  endoterm csúcsként jelenik meg a diffraktogramon, amelynek görbe alatti területe arányos a mért anyag mennyiségével. A 100%-ban amorf anyag diffraktogramján nem láthatunk endoterm csúcsot. Ebből következik, hogy a csak részben amorfizálódott anyag  $T_m$ -nél jelentkező csúcs görbe alatti területe arányos a kristályos frakció mennyiségével. A készülék képes az üveges átmenet detektálására is, egy endoterm alapvonal eltolódás (ún. endoterm lépcső) formájában. Ezen tartomány inflexiós pontját tekinthetjük a  $T_g$ -nek. Ha ezt a lépcsőt egy másik entalpiaváltozással járó történés elfedné, a jelensé-

gek szétválasztására használhatjuk a modulált fűtésű differenciális pásztázó kalorimetriát (MTDSC). A készülék képes elkülöníteni a reverzibilis változásokat az irreverzibilisektől. Az üvegesedési hőmérséklet, mint reverzibilis változás így elkülöníthető például az oldószer-vesztéstől, mint irreverzibilis változástól. Gondot okozhat még, ha kis mennyiségű amorf anyagot tartalmaz a kristályos minta. Ennek detektálására alkalmazhatunk gyors fűtésű differenciális pásztázó kalorimetriát (Hyper-DSC) [17]. A DSC módszer alkalmas kristályossági fok, illetve kristályosodási kinetika meghatározására is, hiszen a kristályos fázis olvadásakor jelentkező endoterm csúcs görbe alatti területe egyenesen arányos a kristályos rész mennyiségével.

Használatos még az amorf fázis kimutatására a porröntgen diffrakció (XRPD) is. Az atomi rácsávolságok nagyságrendjébe eső monokromatikus röntgensugár, az anyag periodikusan ismétlődő építőelemeinek elektronfelhőjéről szóródik. A sugarak különböző szögek alatt mérhető interferenciája (kölsönös erősítése, illetve gyengítése) információt ad az anyag szerkezetéről. Amorf minta esetén eltűnnek a kristályos formára jellemző jellegzetes csúcsok, a görbe úgymond kisimul [18]. A röntgendiffrakció ugyancsak alkalmas kristályossági fok, illetve kristályosodási kinetika meghatározására, hiszen a különböző szögek alatt mért beütések száma attól függ, hogy mennyi kristályos anyagon haladt keresztül a röntgensugár.

Kristályossági fok, illetve kristályosodási kinetika meghatározására alkalmazhatjuk még a dinamikus gőzszorpciós (DVS) készüléket is. A mérések alapját az adja, hogy az anyag amorf állapotban higroszkóposabb, mint a kristályos [19]. Hátánya, hogy a kristályos formában is erősen higroszkópos anyagok amorf formája nem, vagy csak nehezen detektálható.

Használatos még az amorf forma vizsgálatára a Raman-, a Fourier transzformációs infravörös- (FT-IR), a közeli infravörös- (NIR), a diffúz reflexiós Fourier transzformációs infravörös- (DRIFT), és a molekula spektroszkópia; a szilárd fázisú NMR (ssNMR), a termogravimetria (TG), a derivatív termogravimetria (DTG), a dielektromos analízis (DEA), a denzitometria, és a viszkozimetria [1].

A vizsgáló módszereink mindegyikére meg kell adnunk egy ún. legkisebb detektálható (DL: Detection Limit) és legkisebb mérhető mennyiséget (QL: Quantitation Limit) százalékban. Mindkét adat kiszámolására többféle lehetőség adott, amelyeket az ICH (International Conference on

Harmonisation) iránymutatása határoz meg (Q2). Amorf tartalom meghatározásakor a legfontosabb módszer, amely szerint a standard deviáció és a kalibrációs görbe meredekségének a hányadosát 3,3-del szorozva a DL-et 10-zel szorozva pedig a QL-et határozhatjuk meg.

$$DL = 3,3 \sigma / S,$$

$$QL = 10 \sigma / S,$$

ahol a

$\sigma$  = standard deviáció és az

S = a kalibrációs egyenes meredeksége.

### Kísérleti rész

#### Anyagok

A felhasznált anyagok a következők voltak: klopogrel hidrogén-szulfát, ibuprofen, meloxicám, piroxikám (EGIS, Budapest); gemfibrozil, lacidipin, loratadin (TEVA, Debrecen); nifluminsav (Richter Gedeon, Budapest); tenoxicám (Roche, Magyarország); lidokain és teofilin (Hungaropharma).

#### Módszer

Az amorf minták elkészítéséhez, és azok vizsgálatához DSC 821e (Mettler-Toledo, Svájc) készüléket használtunk, 4,8-5,2 mg tömegű mintákkal. A fűtési sebesség 10 °C/min volt. A mérés kezdeti és végső hőmérsékletének anyagonként különböző választottunk azok olvadáspontjától függően, úgy hogy az anyag minden esetben teljesen megolvadjon, de ne szenvedjen bomlást.

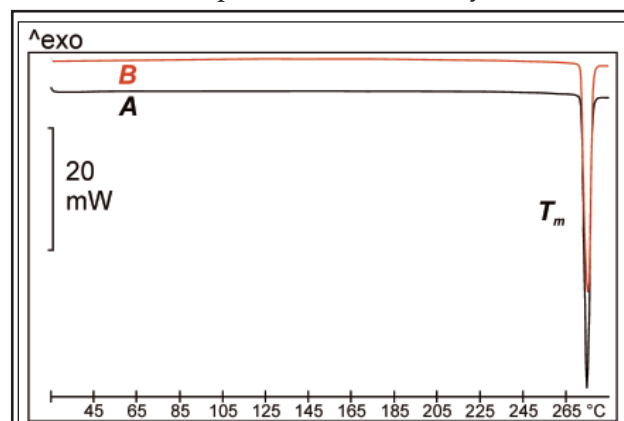
A kiindulási kristályos mintát fedett, lyukasztott standard alumínium téglékbe helyeztük. Az első fűtés során a mintát olvadáspontja felé hevítettük, majd a teljes olvadás után visszahűtöttük szobahőmérsékletre  $45 \pm 5$  °C/min hűtési sebességgel. Ezután azonnal újra felfűtöttük, és a kapott eredményeket elemeztük. A második fűtés kezdeti hőmérsékletét úgy határoztuk meg, hogy a mérés a  $T_m$  Kelvinben mért 2/3-ánál kisebb értékről induljon.

#### Eredmények

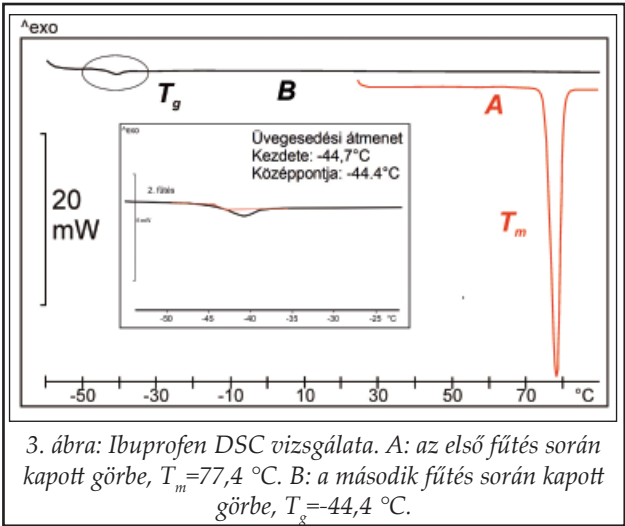
A kapott eredmények alapján két csoportba sorolhatjuk a 13 vizsgált anyagot. Az első csoportba tartoznak azok az anyagok, amelyeknek amorf formáját nem sikerült előállítani. A második csoportba pedig azok az anyagok, amelyeknél el tud-

tuk érni az üveges állapotot. Az első csoportot a teofilin DSC diffraktogramján keresztül mutatjuk be (2. ábra). Az ábrán a két fűtés során kapott görbék láthatóak. Az első fűtés során (A) kapott endoterm csúcs, amely az olvadást jelzi, a második fűtés (B) alkalmával is megjelent. Habár a görbe alatti terület a második fűtéskor némiképp csökkent, ami a szabályos kristályrács elvesztésére, tehát amorfizálódásra utalhat, de  $T_g$ -t nem tudunk detektálni. Ezek alapján kijelenthető a  $T_g/T_m$  arányt alapul véve, hogy a teofilin rosszul amorfizálódik. A 13 vizsgált anyag közül a tenoxicám, a mannit, a nifluminsav, a teofilin és a lidokain került ebbe a csoportba. Az ilyen anyagok formulálása során nem számíthatunk számottevő amorfizálódásra.

A második csoport anyagait az általunk alkalmazott eljárással (olvadékhűtéssel) sikerült amorfizálni, a kapott eredmények alapján az anyagokat két alcsoportba sorolhatjuk. Az első alcsoportba azok az anyagok tartoznak, amelyek  $T_g/T_m$  aránya elmarad 0,7-től, tehát rosszul amorfizálódónak tekintjük őket. Ilyen volt az ibuprofen (3. ábra). A példaként bemutatott DSC görbén látható, hogy a kezdetben kristályos ibuprofent az első fűtés (A) amorfizálta, mivel a második fűtés (B) görbéjén nem látható az olvadás endoterm csúcsa. A második fűtést -60 °C-ról indítottuk, mivel a  $T_g$  a negatív hőmérsékleti intervallumban volt várható. Ebbe az alcsoportba sorolható továbbá a meloxicám és a határértéken fekvő piroxikám is. Az ilyen anyagok formulálásakor már a kevésbé agresszív behatások is amorfizálhatják az anyagot. Mindezek ellenére javasolható kristályos formában történő formulálásuk, hiszen ezeket az anyagokat csak nehezen, nagy energia befektetésével lehet amorf állapotba vinni. Kristályos formulá-

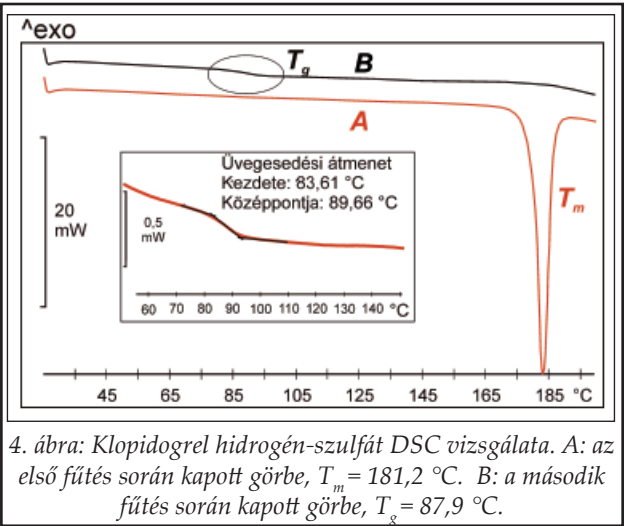


2. ábra: Teofilin DSC vizsgálata. A: az első fűtés során kapott görbe,  $T_m(A) = 274,7$  °C. B: a második fűtés során kapott görbe,  $T_m(B) = 272,3$  °C.



lásuk során kevésbé kell számolnunk az amorf forma megjelenésével.

A második alcsoport anyagainak a  $T_g/T_m$  aránya nagyobb, mint 0,7, így jól amorfizálódónak tekinthetjük őket. A klopido­grel hidrogén-szulfát DSC görbéjén látszik, hogy az első fűtés során (A) az anyag megolvadt, majd a visszahűtést követően, a második fűtéskor (B) eltűnt az olvadás endoterm csúcsa, és megjelent az üveges átmenet (4. ábra). Ha kristályos végtermék a cél, akkor a formulálás egésze során figyelemmel kell kísérnünk az anyag szerkezetét. Ugyanakkor az így viselkedő anyagok esetében javasolható az amorf formában való alkalmazás, hiszen könnyen üveges állapotba hoz-



hatóak, és a megfelelő segédanyagokkal sokáig amorfak is maradnak. Ebbe a csoportba sorolható továbbá a lacidipin, a gemfibrozil, a szorbit, a loratadin és a klórhexidin is.

Az összes vizsgált anyag mérési eredményeit és amorfizálhatóságát az **I. táblázat** foglalja össze.

Megfigyelhető, hogy a hasonló molekulaszervezetű anyagok, mint például az egyforma alapvázú oxikámok, vagy a szorbit és a mannit, melyek egymás diasztereomerei, teljesen eltérően amorfizálódnak.

Kijelenthető, hogy az esetek nagy részében a  $T_g$  a  $T_m$  2/3-a illetve 4/5-e közé esett, tehát ezen értékek alkalmazhatóak a  $T_g$  előzetes megkeresésére.

I. táblázat

A vizsgált anyagok  $T_m$ ,  $T_g$  és  $T_g/T_m$  értékei

Hatóanyagok	Olvadáspont ( $T_m$ ; °C)	Üvegesedési hőmérséklet ( $T_g$ ; °C)	$T_g/T_m$ (K/K)	Amorfizálhatóság	$T_g$ a $T_m$ 2/3-4/5-e között
Tenoxicam	226,0	-	-	rossz	-
Mannit	166,9	-	-	rossz	-
Nifluminsav	205,4	-	-	rossz	-
Teofillin	271,6	-	-	rossz	-
Lidokain	70,1	-	-	rossz	-
Meloxicám	264,0	63,5	0,63	rossz	nem
Ibuprofen	77,4	-42,5	0,66	rossz	nem
Piroxikám	203,1	58,1	0,70	határérték	igen
Lacidipin	184,8	54,4	0,71	jó	igen
Gemfibrozil	61,5	-29,2	0,73	jó	igen
Szorbit	91,4	0,77	0,75	jó	igen
Loratadin	137,6	40,4	0,76	jó	igen
Klopido­grel HSO <sub>4</sub>	181,2	88,9	0,80	jó	igen
Klórhexidin	140,3	61,7	0,81	jó	nem

## Összegzés

Végezetül kijelenthető, hogy az amorf forma jelenléte nagy figyelmet érdemel a gyógyszer technológus részéről. Fontos amorfizálhatósági vizsgálatokat végezni a formulálni kívánt ható-, illetve segédanyagokon egyaránt, hiszen számos olyan technológiai folyamaton mennek keresztül, amelyek részben vagy teljesen amorfizálhatják az anyagot. Elvégeztünk egy termoanalitikai gyorsítást 13 különböző anyagon, amellyel megállapítottuk az amorfizálhatóságukat. Az értékek tükrében kijelenthető, hogy az amorfizálhatósági vizsgálatokat minden egyes anyagnál egyedileg kell elvégezni, mert egymásra szerkezetileg hasonlító anyagoknál is jelentős eltérések adódhatnak.

## Köszönetnyilvánítás

Ez a munka az Új Magyarország Fejlesztési Terv támogatásával valósult meg: *Keringési, anyagcsere és gyulladási betegségek teranostikájának fejlesztése* (TÁMOP-4.2.2-08/1-2008-0013).

## IRODALOM

1. Cui, Y.: *Int. J. Pharm.* 339, 3-18 (2007).
2. Kauzmann, W.: *Chem. Rev.* 43, 219-256 (1948).

3. Yu, L.: *Adv. Drug Deliver. Rev.* 48, 27-42 (2001).
4. Laczkovich, O., Révész, P.: *Magyar Kémiai Folyóirat* 116, 102 (2010).
5. Kim, J.S., Kim, M.S., Park, H. J., Jin, S.J., Lee, S., Hwang, S.J.: *Int. J. Pharm.* 359, 211-219 (2008).
6. DiNunzio J. C., Brough C., Hughey J. R., Miller D. A., Williams III R. O., McGinity J. W.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74, 340-351 (2010).
7. Kim, M.S., Jin, S.J., Park, H. J., Song, H.S., Hwang, S.J.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 454-465 (2008).
8. Zhang, F., Aaltonen, J., Tian, F., Saville, D. J., Rades, T.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71, 64-70 (2009).
9. Chieng, N., Rades T., Saville D.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68, 771-780 (2008).
10. Vollenbroek, J., Hebbink, G. A., Ziffels, S., Steckel, H.: *Int. J. Pharm.* 395, 62-70 (2010).
11. Szűts, A., Pallagi, A., Regdon, G. Jr., Aigner, Z., Révész, P.: *Int. J. Pharm.* 336, 199-207 (2007).
12. Mallick, S., Pattnaik, S., Swain, K., De, P. K., Saha, A., Ghoshal, G., Mondal, A.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68, 346-351 (2008).
13. Mura, P., Cirri, M., Fauci, M.T., Gine's-Dorado, J.M., Bettinetti, G.P.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30, 227-237 (2002).
14. Sharma, P., Sharma, P., Denny, W. A., Garg, S.: *Int. J. Pharm.* 380, 40-48 (2009).
15. Christensen, K.L., Pedersen, G.P., Kristensen, H.G.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53, 147-153 (2002).
16. Bozic, D. Z., Dreu, R., Vrecer, F.: *Int. J. Pharm.* 357, 44-54 (2008).
17. Saunders, M., Podlun, K., Shergill, S., Buckton, G., Royall, P.: *Int. J. Pharm.* 274, 35-40 (2004).
18. Chen, X., Bates, S., Morris, K.R.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26, 63-72 (2001).
19. Mackin, L., Zanon, R., Park, J. M., Foster, K., Opalenik, H., Demonte, M.: *Int. J. Pharm.* 231, 227-236 (2002).

Érkezett: 2011. február 24.



## Szacharóz-laurát olvadéktechnológiai alkalmazhatósága

LÁNG PÉTER, SZŰTS ANGÉLA, AMBRUS RITA, \*SZABÓNÉ RÉVÉSZ PIROSKA

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai Intézet

6720 Szeged, Eötvös u. 6.

\*Levelezési cím: revesz@pharm.u-szeged.hu

### Summary

Láng, P., Szűts, A., Ambrus, R., Szabóné Révész, P.: *The applicability of sucrose laurate in hot-melt technology*

Nowadays, one of the most important task of the pharmaceutical technology is to optimize the dissolution of active ingredients, because most of the drug candidates have a poorly water solubility and hence a slow absorption. According to the latest examinations, the bioavailability of poorly water soluble drugs can be increased significantly by using surfactants or the mixture of surfactants and polymers. Nowadays, surfactants (like polysorbates) are generally used in the production of solid dispersions, so the use of surface-active sucrose esters can be resulted an innovative solution in the pharmaceutical technology.

The aim of our investigation was to examine the applicability of sucrose laurate in hot-melt technology in order to influence the crystalline structure and dissolution rate of a poorly water soluble drug (gemfibrosil) having low-melting point.

The results of the X-ray powder diffractometry have showed that the sucrose laurate had no significant effect on the crystallization degree of the drug which is important in case of the stability. On the bases of the results of in-vitro dissolution studies, it can be concluded that the sucrose laurate (using minimum 5%) can be well applied in hot-melt technology with carriers having characteristic melting point (e.g. Macrogol) to increase the dissolution rate of poorly soluble drugs.

**Keywords:** sucrose laurate, hot-melt technology, solid dispersions, dissolution rate, gemfibrosil.

### Összefoglalás

Napjainkban a gyógyszer technológiai kutatás egyik legfontosabb feladata a hatóanyag-felszabadulás optimalizálása, mivel a legtöbb farmakon-jelölt rossz vízoldékonysággal és ebből kifolyólag lassú felszívódással rendelkezik. Újabb vizsgálatok szerint felületaktív anyagokat, vagy polimerek és felületaktív anyagok keverékét alkalmazva, jelentősen növelhető a rossz vízoldékonyságú hatóanyagok biológiai hasznosulása. A szilárd diszperziók előállításában általánosan alkalmazott felületaktív anyagok (pl. poliszorbátok) mellett a cukorészterek használata innovatív megoldást jelenthet.

Vizsgálatunk célja a szacharóz-laurát olvadéktechnológiai alkalmazhatóságának vizsgálata egy rossz vízoldékonysággal rendelkező, alacsony olvadáspontú hatóanyag (gemfibrozil) kristályos jellegének, illetve oldódási sebességének befolyásolására.

A porröntgen vizsgálatok eredményei azt igazolták, hogy a szacharóz-laurátnak a hatóanyag kristályosságára nincs szignifikáns hatása, ami a termék stabilitását tekintve fontos szempont. Az in vitro kioldódási vizsgálatok eredményei alapján megállapítható, hogy a szacharóz-laurát jól alkalmazható az olvadéktechnológiában rossz vízoldékonyságú hatóanyagok oldódási sebességének növelésére, amennyiben egy határozott olvadással rendelkező segédanyag (pl. Makrogol) mellett, legalább 5%-ban alkalmazzuk.

**Kulcsszavak:** szacharóz-laurát, olvadéktechnológia, szilárd diszperziók, oldódási sebesség, gemfibrozil.

### Bevezetés

A szacharóz-zsírsvésztereket (cukorészterek) eddig is alkalmazták az élelmiszer- és kozmetikaiparban kristályosodás-gátló [1], valamint tetszetős megjelenést kölcsönző (krémek) hatásuk miatt. Újabban a gyógyszeripar is felfigyelt rájuk, mint gyógyszer technológiai segédanyagokra, emulgens [2], lubrikáns [3], gélképző [4], nedvesítő és retardizáló [5-11] tulajdonságaik miatt.

A cukorészterek nem-ionos felületaktív anyagok, melyek hidofil részként szacharózt, lipofil részként pedig zsírsvéket tartalmaznak. Kedvező tulajdonságaik, hogy természetes eredetűek, ízte-  
lenek, nem toxikusak, illetve biodegradálhatók.

Változatos HLB-érték (Hydrophilic-Lipophilic Balance) jellemző rájuk [12]. Ezért, továbbá felületaktív sajátosságuk és alacsony olvadáspontjuk miatt az olvadéktechnológia ígéretes segédanyagai.

Az olvadéktechnológia a biológiai hatáskifejlődés módosításának egyik kedvelt módszere manapság. Nagy előnye, hogy nem használ szerves oldószert, ezért az úgynevezett „green-technológiák” közé sorolható. Hátránya, hogy hőre érzékeny hatóanyagok esetében nem alkalmazható. Újabban gyakran alkalmaznak felületaktív anyagokat, vagy polimerek és felületaktív anyagok keverékét szilárd diszperziók előállítására a hatóanyag kedvezőbb biohasznosulása céljából [13].

Az első leírás szilárd diszperziókról Sekiguchitól

és *Obitol* származik [14]. Megállapították, hogy eutektikus keverékek formulálásával növelni lehet a hatóanyag-felszabadulást, ezáltal a biohasznosulást, rossz vízdékonysággal rendelkező hatóanyagok esetében. Kezdetben kristályos anyagokat, például az ureát, mint jó vízdékonysággal rendelkező segédanyagot használták hordozóként egy rossz vízdékonyságú hatóanyag (szulfatiazol) oldódási sebességének a növelésére [15]. Később, a '60-as évek végén, jelentek meg a II. generációs szilárd diszperziók, amelyeknél kristályos hordozó helyett, szemikristályos vagy teljesen amorf anyagokat, például polietilén-glikolokat, vagy polivinilpirrolidont alkalmaztak [16].

Manapság pedig a szilárd diszperziók III. generációjáról beszélhetünk; ide különféle polimer-keverékek, polimer és felületaktív anyagok, valamint simán felületaktív anyagok tartoznak.

Kísérletünk célja egy nagy HLB-értékkel rendelkező cukorészter (szacharóz-laurát) olvadéktechnológiában való alkalmazhatóságának a vizsgálata volt. Meghatároztuk a kiválasztott cukorészter hatását egy alacsony olvadáspontú, rossz vízdékonyságú hatóanyag (gemfibrozil) kristályos jellegére, továbbá oldódási sebességére.

### Kísérleti rész

#### Anyagok és módszerek

##### Anyagok

Modell hatóanyagként a rossz vízdékonyságú (BCS szerinti II-es besorolás) gemfibrozil (TEVA, Magyarország) alkalmaztuk. A vizsgált cukorészter, az L1695 szacharóz-laurát (Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation, Japán) mellett polimer vivőanyagként a PEG 6000-et (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Németország) használtuk, amelynek olvadáspontja (61 °C) egybe esik a gemfibrozilével.

##### Minták előállítása

Az olvadékok készítésekor a szilárd PEG 6000-et porcelántégelyben 70 °C körüli hőmérsékleten megolvasztottuk, majd a szacharóz-laurátot és a gemfibrozilt feloldottuk benne és a mintákat mélyhűtőben -10 °C-on megdermesztettük. Ezután dörzsmozsárban elporítottuk, majd szitáltuk a termékeket (< 200 µm). A mintákban a hatóanyag (10, 40%) és a cukorészter (1, 5, 10, 15%) is többféle koncentrációban volt jelen. Összehasonlításként, cukorészter nélküli és csak cukorészter-tartalmú olvadékokat is készítettünk (*I. és II. táblázat*).

*I. táblázat*

40% hatóanyagtartalmú minták

GEM	L1695	PEG	Minta neve
40	1	59	GEM-PEG-L1695 40-59-1
40	5	55	GEM-PEG-L1695 40-55-5
40	10	50	GEM-PEG-L1695 40-50-10
40	15	45	GEM-PEG-L1695 40-45-15
40	0	45	GEM-PEG-40-45
40	0	50	GEM-PEG-40-50

*II. táblázat*

10% hatóanyagtartalmú minták

GEM	L1695	PEG	Minta neve
10	1	89	GEM-PEG-L1695 10-89-1
10	5	85	GEM-PEG-L1695 10-85-5
10	10	80	GEM-PEG-L1695 10-80-10
10	15	75	GEM-PEG-L1695 10-75-15
10	0	75	GEM-PEG-10-75
10	0	80	GEM-PEG-10-80

#### Porröntgen vizsgálat (XRPD)

A minták szerkezetvizsgálatát porröntgen diffraktometriával végeztük el (Miniflex II Rigaku porröntgen diffraktometer, Rigaku Co. Tokyo, Japan). A mérési paraméterek a következők voltak: CuK $\alpha$  = 1,5405 Å; 30 kV; 15 mA.

#### *In vitro* kioldódás vizsgálat

A hatóanyag-felszabadulást a termékekből Pharmatest forgólapátos kioldó készülékkel vizsgáltuk (100 rpm, 37 °C). Mintákat 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 perc után vettünk. A hatóanyagtartalom meghatározása spektrofotometriásan (Unicam UV/Vis spektrofotométer) történt (= 276 nm). A kioldó közeg 100 ml mesterséges bélnedv (pH = 6,8) volt.

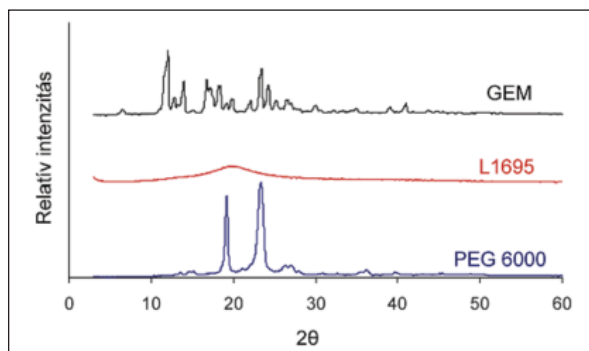
### Eredmények

Korábbi kutatások eredményei alapján [17] a hidrofíli cukorészterek önálló alkalmazása az olvadéktechnológiában korlátozott, ezért jelen munkánkban a vizsgált hidrofíli szacharóz-laurátot egy polimer hordozó (PEG 6000) mellett alkalmaztuk.

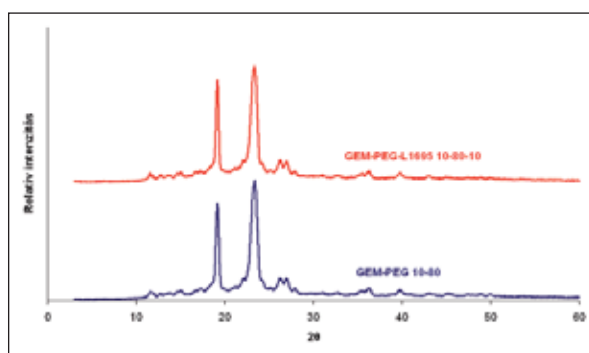
Az 1. ábra a kiindulási anyagok porröntgen felvételeit mutatja. A gemfibrozil kristályos anyag, ezzel szemben a szacharóz-laurát a vizsgált tartományban nem rendelkezik karakterisztikus csúcsokkal (porröntgen képe amorf anyagra jellemző), míg a PEG 6000 szemikristályosnak mondható.

Az olvadéktechnológiával előállított termékek porröntgen analízise során célunk volt megvizsgálni a szacharóz-laurátnak a gemfibrozil kristályosodására kifejtett hatását. Összehasonlítottuk tehát a cukorészter nélküli, illetve azt tartalmazó termékek diffraktogramjait, a különböző hatóanyag-tartalom (10, 40%), illetve cukorészter koncentráció (1, 5, 10, 15%) esetében is. Mivel a termékek előállítása során a PEG-szacharóz-laurát rendszerben a hatóanyag is megolvad/feloldódik, így számolni kell azzal, hogy az olvadék dermesztése során a szacharóz-laurát kristályosodás-gátló sajátsága kerül előtérbe. Az eredmények azonban azt mutatták, hogy sem a hatóanyag, sem pedig a PEG kristályosságára nincs szignifikáns hatással a cukorészter.

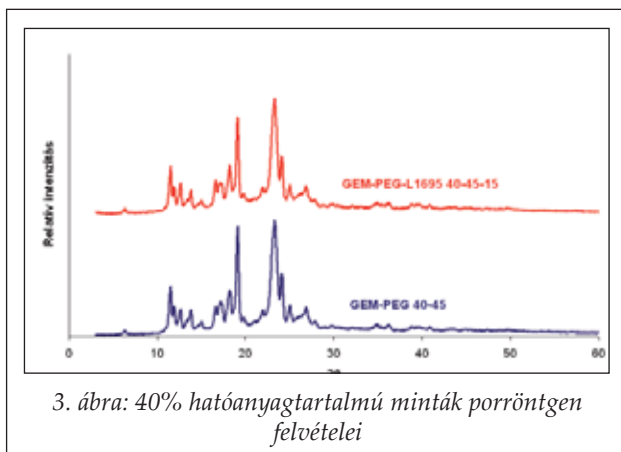
Amennyiben a hatóanyag kisebb mennyiségben (10%) volt jelen a termékekben, a gemfibrozilra jellemző karakterisztikus csúcsok nem voltak láthatóak a porröntgen diffraktogramon, ami azonban



1. ábra: A ható- és segédanyagok porröntgen felvételei



2. ábra: 10% hatóanyag-tartalmú minták porröntgen felvételei



3. ábra: 40% hatóanyag-tartalmú minták porröntgen felvételei

nem a cukorészternek köszönhető, hanem feltehetőleg az alacsony gemfibrozil koncentrációnak és az igen magas PEG mennyiségnek (2. ábra).

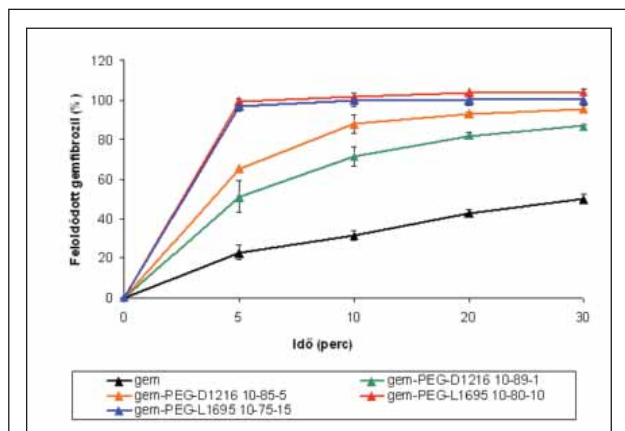
Abban az esetben, amikor nagyobb koncentrációban alkalmaztuk a hatóanyagot, tehát a hatóanyag-tartalom 40% volt, a gemfibrozil továbbra is kristályos sajátságot mutatott, amelyen a 15%-ban alkalmazott cukorészter sem változtatott (3. ábra).

A szacharóz-laurát befolyását a hatóanyag-fel szabadulásra *in vitro* kioldódás mérésekkel vizsgáltuk, amelyet a hatóanyag felszívódáshelyéből adódóan mesterséges bélnedvben végeztünk el.

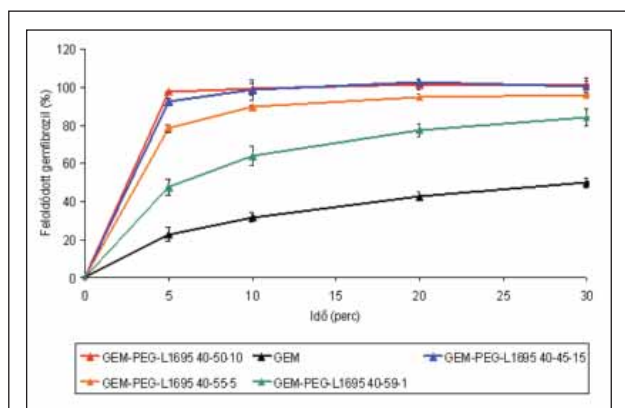
Amennyiben azt vizsgáltuk, hogy önmagában a gemfibrozil mennyire képes feloldódni, azt kaptuk, hogy a 120. perc végére is csak a hatóanyag 60%-a oldódott ki. Ezt követően cukorészter nélküli, csak PEG 6000-et tartalmazó minták kioldódását vizsgáltuk. Mindkét hatóanyag-tartalmú sorozat esetében elmondhatjuk, hogy a PEG 6000 önmagában is növelte az oldódási sebességet, valamint még 2 óra elteltével sem volt 100% a kioldódott gemfibrozil mennyisége, és a 80%-os kioldódáshoz is 1 órára volt szükség.

Ezután a különböző koncentrációban (1, 5, 10, 15%) L-1695 szacharóz-laurátot tartalmazó olvadéktechnológiával előállított minták hatóanyag-fel szabadulását vizsgáltuk meg (4. és 5. ábra). Mindkét hatóanyag-tartalmú sorozat esetében jól látszik, hogy már az 1% cukorésztert tartalmazó mintáknál is jelentősen nő az oldódási sebesség, de a 100%-ot nem éri el, csupán 90% körüli (4. és 5. ábra). Ugyanezt az eredményt el lehet érni csak PEG alkalmazásával, vagyis 1% szacharóz-laurátnak nincs szignifikáns hatása a hatóanyag-kioldódásra. 5% cukorészter már jelentősen növeli az oldódási sebességet, de még így sem érjük el a 100% kioldódást.

Amennyiben a cukorészter koncentrációját 10, illetve 15%-ra növeljük, egy pillanatszerű, 100%-os



4. ábra: 10% hatóanyagtartalmú minták kioldódási görbéi



5. ábra: 40% hatóanyagtartalmú minták kioldódási görbéi

kioldódást kapunk már az első 5 percben. Megjegyzendő azonban, hogy a cukorészter-tartalmat nem érdemes 15% fölé emelni, mert a 10 és a 15% tartalmú minták kioldódási profilja közötti különbség nem szignifikáns.

### Következtetések

Kísérletünk alapján elmondható, hogy a nagy HLB-értékkel rendelkező szacharóz-laurát (L-1695) jól alkalmazható rossz vízoldékonysággal rendelkező hatóanyag oldódási sebességének növelésére, amennyiben egy karakteres olvadásponttal rendelkező hordozó jelenlétében alkalmazzuk legalább 5%-ban. A pillanatszerű, 100% kioldódáshoz elég 10%-ban alkalmazni a szacharóz-laurátot gemfibrozil esetében. Megállapítható továbbá, hogy a cukorészternek ebben az esetben a hatóanyag kristályosságára nem volt hatása.

Mivel a cukorészterek nem toxikusak, biodeg-

radábilisek, valamint alacsony hőmérsékleten lágyulnak, ezért a környezetbarát olvadéktechnológia ígéretes segédanyagai.

### Köszönetnyilvánítás

Ez a munka az Új Magyarország Fejlesztési Terv támogatásával valósult meg: *Keringési, anyagcsere és gyulladásos betegségek teranosztikájának fejlesztése* (TAMOP-4.2.2-08/1-2008-0013).

### IRODALOM

- Awad, T., Sato, K.: Colloids Surf. B. 25, 45-53 (2002).
- Garti, N., Aserin, A., Faunn, M.: Colloids Surf. A. 164, 27-38 (2000).
- Shibata, D., Shimada, Y., Yonezawa, Y., Sunada, H., Kasa-hara, K.: J. Pharm. Sci. Technol. Japan 62, 133-145 (2002).
- Szűts, A., Budai-Szűcs, M., Erős, I., Ambrus, R., Otomo, N., Szabó-Révész, P.: J. Excipients and Food Chem. 1, 13-20 (2010).
- Dredán, J., Csóka, G., Marton, S., Antal, I.: Acta Pharm. Hung. 3, 147-151 (2003).
- Csóka, G., Marton, S., Klebovich, I.: Study of solid in solid mixtures of ibuprofen and different sugar fatty acid esters. 1<sup>st</sup> BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, pp. 119-122 (2005).
- Csóka, G., Marton, S., Zelko, R., Otomo, N., Antal, I.: Eur. J. Pharm. Biopharm. 65, 233-237 (2007).
- Hahn, L., Sucker, H.: Pharm. Res. 6, 958-960 (1989).
- Ntawukuliyayo, J. D., Bouckaert, S., Remon, J. P.: Int. J. Pharm. 93, 209-214 (1993).
- Otsuka, M., Ofusa, T., Matsuda, Y.: Colloids Surf. B. 10, 217-226 (1998).
- Marton, S., Anner, A., Csoka, G.: Increased solubility applying solid-in-solid solutions. 6th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Biotechnology. Eur. J. Pharm. Sci. 25S1, S155-S157 (2005).
- Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation: Ryoto Sugar Ester Technical Information. Nonionic surfactant/Sucrose fatty acid ester/Food additive (1982)
- Vasconcelos, T., Sarmento, B., Costa, P.: Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs, Drug Discovery Today, 12, 1068-1075 (2007).
- Sekiguchi, K., Obi, N.: Studies on Absorption of Eutectic Mixture. II. Absorption of Fused Conglomerates of Chloramphenicol and Urea in Rabbits. Chem. Pharm. Bull (Tokyo) 12, 134-144 (1964).
- Sekiguchi, K., Obi, N.: Studies on Absorption of Eutectic Mixture. I. A comparison of the behavior of eutectic mixtures of sulphathiazole and that of ordinary sulphathiazole in man. Chem. Pharm. Bull. 9, 866-872 (1964).
- Vilhelmsen, T., et al.: Effect of a melt agglomeration process on agglomerates containing solid dispersions. Int. J. Pharm. 303, 132-142 (2005).
- Szűts, A.: Study of the applicability of sucrose esters in hot-melt technology, PhD Thesis, Szeged (2008).







# Szerzői útmutató

As *Acta Pharmaceutica Hungarica* a gyógyszerészeti tudományok területéről kiadott orvosi, kísérletes kutatásokról szóló tudományos közleményeket, de főként kísérleti és orvosi kísérletes (fiziológiai, anatómiai) tanulmányokat, valamint Ph.D. és D.Sc. értekezések kiegészítő kiadványait is.

Hasonló körülmények vagy olyan speciális kollektívák számára nyitva tartjuk a kiadványt, ahol az első szerzők számára. Lehetőség van közzétételre helyettesítő szerzővel, kiegészítő jelentőségű közlemények számára nyitva tartjuk a kiadványt is, az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

## Közzététel feltételei

1. *Összefoglaló közlemények*, legfeljebb 25 gépettel oldal terjedelemben. Ezek megírására általában a szerkesztőséghez kell fordulni. Kérjük meg, illetve az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

2. *Közzététel*, legfeljebb 12 gépettel oldal terjedelemben. Az ábrák és táblázatok együttes mérete maximum 10 lehet.

3. *Rövid közlemények*, legfeljebb 4 gépettel oldal terjedelemben (maximálisan legfeljebb 4 ábra és táblázat). A közlemények megírására maximum 1000 karakterrel a rövid közlemények elnyújtásának.

4. *Ph.D. értekezések összefoglaló közlemények*, legfeljebb 25 oldal terjedelemben.

Feladatunk nagy terjedelmű dolgozatok esetében a szerkesztőséghez fordulni. Kérjük meg, illetve az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

## A kiadvány kiadásának módja

### a) Általános információk

A kiadványt elektronikus, online formában kell a szerkesztőséghez e-mail címmel elküldeni a szerkesztőséghez.

A kiadványt ki kell küldeni, és az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

As *Acta* és egyéb kiadványok olyan szerkesztői kiadványok, hogy azok nyomtatott kiadványok kiadásának legyenek. As *Acta* kiadványt ki kell küldeni, és az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

As *Acta* kiadványt ki kell küldeni, és az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

### A kiadvány kiadásának módja

#### Feladatunk

1. *Acta*, L. K., *Acta*, S. M., *Acta*, R. J., *Acta*, L. C. J. *Pharm. Sci.* 86, 481-484 (1997)

#### Szerzők

2. *Gyermek*, L., *Acta*, L., *Acta*, J., *Acta*, L. As a gyógyszer-technológia és kísérletes kutatás kiadványának kiadásának. *Medicina*, Budapest, 1982. 147-152. old.

#### Közzététel

3. *Acta*, R. J., *Acta*, L. K., *Acta*, S. M., *Acta*, R. J., *Acta*, L. C. J. *Pharm. Sci.* 86, 481-484 (1997)

## Szerzők

4. *Acta*, L. K., *Acta*, S. M., *Acta*, R. J., *Acta*, L. C. J. *Pharm. Sci.* 86, 481-484 (1997)

Közzététel

5. *Acta*, R. J., *Acta*, L. K., *Acta*, S. M., *Acta*, R. J., *Acta*, L. C. J. *Pharm. Sci.* 86, 481-484 (1997)

6. *Acta*, L. K., *Acta*, S. M., *Acta*, R. J., *Acta*, L. C. J. *Pharm. Sci.* 86, 481-484 (1997)

7. *Acta*, L. K., *Acta*, S. M., *Acta*, R. J., *Acta*, L. C. J. *Pharm. Sci.* 86, 481-484 (1997)

8. *Acta*, L. K., *Acta*, S. M., *Acta*, R. J., *Acta*, L. C. J. *Pharm. Sci.* 86, 481-484 (1997)

9. *Acta*, L. K., *Acta*, S. M., *Acta*, R. J., *Acta*, L. C. J. *Pharm. Sci.* 86, 481-484 (1997)

10. *Acta*, L. K., *Acta*, S. M., *Acta*, R. J., *Acta*, L. C. J. *Pharm. Sci.* 86, 481-484 (1997)

## A kiadvány kiadásának módja

A kiadványt elektronikus, online formában kell a szerkesztőséghez e-mail címmel elküldeni a szerkesztőséghez.

A kiadványt ki kell küldeni, és az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

A kiadványt ki kell küldeni, és az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

A kiadványt ki kell küldeni, és az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

A kiadványt ki kell küldeni, és az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

A kiadványt ki kell küldeni, és az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

A kiadványt ki kell küldeni, és az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

A kiadványt ki kell küldeni, és az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

## A kiadvány kiadásának módja

A kiadványt ki kell küldeni, és az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

A kiadványt ki kell küldeni, és az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

A kiadványt ki kell küldeni, és az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

## A kiadvány kiadásának módja

A kiadványt ki kell küldeni, és az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

## A kiadvány kiadásának módja

A kiadványt ki kell küldeni, és az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

A kiadványt ki kell küldeni, és az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

A kiadványt ki kell küldeni, és az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

A kiadványt ki kell küldeni, és az első szerzőkkel közösen írtakról szóló egy éven belül, az első kiadás kiadásig tartó időtartamra nyitva tartjuk.

